

BEWARING VAN MELK EN ROOM ONDER ZUUR-STOFDRUK

DOOR

J. VAN BEYNUM EN J. W. PETTE

(Ingezonden 14 Juni 1938)

1. Conserveering van melk

Melk is een vloeistof, die zeer gemakkelijk in bacteriëel bederf overgaat, want zij is voor bacteriën een goed voedsel. Een snelle bacteriegroei wordt mogelijk gemaakt door de aanwezigheid van koolhydraten en gemakkelijk aantastbare eiwitten. Naar gelang van omstandigheden kan het bederf zich uiten door een aantasting van de melksuiker onder zuurvorming (melkzuur) of door een ontleding van eiwitten.

Dit bacteriëel bederf van de onbehandelde melk is niet te verhinderen, daar zij altijd bacteriën bevat. Voor een deel zijn deze afkomstig uit het melkafscheidingsorgaan, voor een ander deel wordt de melk tijdens en na de winning met bacteriën besmet, die er van de huid of uit de lucht of van het melkgereedschap inraken.

Daar de melk zoo'n waardevol voedingsmiddel is, heeft men altijd pogingen in het werk gesteld om dit natuurlijke bederf te verhinderen. Chemicaliën hebben daarbij niet voldaan, omdat zij meestal invloed hebben op de stoffen der melk of omdat zij voor den consument schadelijk kunnen zijn. Het doden van de bacteriën door hitte (bijv. sterilisatie bij 115°—120° C) is afdoende, doch voldoet niet in de praktijk, omdat smaak en geur van aldus behandelde melk te veel veranderen. Het ideaal van melkconserveering is een zoodanig proces, dat de melk in geen enkel opzicht veranderd wordt. Daarom heeft ook het bewaren van melk bij lage temperaturen, dus in bevroren toestand, niet tot het beoogde doel geleid. Hierbij n.l. verandert de eiwitstructuur der melk en wordt ook de fijne verdeling van het vet beïnvloed.

Bestraling met voor bacteriën schadelijk ultraviolet licht heeft evenmin bij melk succes gehad.

Met het oog op den eisch, dat geen chemicaliën mochten worden toegevoegd heeft men ook met gasen geëxperimenteerd en daar de verschillende chemisch niet-actieve gasen bij gewonen druk weinig of geen effect hebben, zijn deze

gassen toegepast bij hoogerem druk. Men moet dan onderscheid maken tusschen twee factoren:

1. de werking van den hoogen druk en
2. de werking van het gas zelf op de bacteriën.

Wat het eerste betreft, een hooge druk alleen is slechts van weinig invloed op de bacteriën. Pas bij uitermate hoogen druk, zóó hoog, dat de toepassing voor practische doeleinden niet in aanmerking komt, worden bacteriën geschaad of zelfs gedood. In een der laatst verschenen verhandelingen over den invloed van hoogen druk (1) wordt medegedeeld, dat *Bact. coli* pas bij drukken boven 5.000 atmosferen sterft en dat de sporen van *B. subtilis* nog niet bij een druk van 20.000 atmosferen geschaad worden. Bij deze en andere dergelijke proeven was de inwerkingsduur van den hoogen druk niet lang, bijv. ongeveer 1 uur. Bij langdurige toepassing van zeer hooge drukken zal men ongetwijfeld andere waarden vinden en indien men zich vergenoegt met het bereiken van een ontwikkelingsverhinderling, zullen hiertoe wel lagere drukwaarden voldoende zijn, doch men heeft hier te maken met in ieder geval zeer hoogen druk. Bij een proefduur van 14 uur was ook nog een druk van 6.000 atmosferen noodig om dooding der bacteriën te bereiken (2).

Bij het gebruik van gassen onder druk komen slechts de chemisch weinig of niet-actieve gassen in aanmerking. Dat zijn dus bijv. stikstof, waterstof, zuurstof, helium en koolzuur.

Voor zoover een gas geen enkele biologische werking vertoont, zooals wij bijv. kunnen verwachten van stikstof, helium en waterstof (welke hoogstens den aeroben toestand in een anaeroben veranderen) zullen zij slechts werking ontvouwen door den druk, d.i. dus pas bij zeer hoogen druk. Geen effect werd bijv. verkregen door stikstof onder 120 atmosferen druk (2).

Indien het gas niet als biologisch inactief gekenmerkt kan worden, kan een conserveerende werking bij lagere drukken verwacht worden, hoewel bij dergelijke gassen dan ook weer rekening gehouden moet worden met een mogelijke inwerking op de gevoelige melkbestanddeelen.

Van de genoemde gassen zijn koolzuur en zuurstof niet geheel inactief. Koolzuur bijv. heeft bij hoogen druk invloed op den pH der melk, zoodat een eventueele werking van dit gas voor een deel aan deze zuurgraadsverandering moet worden toegeschreven. Bij 50 atmosferen koolzuurdruk werd bijv. *Bact. coli* in $1\frac{1}{2}$ à $2\frac{1}{2}$ uur gedood (2). De pH was daarbij ongeveer 4.

PRUCHA, BRANNON en RUEHE (3) deden proeven met melk onder koolzuurdruk. Bij 21°C was de rauwe melk onder een druk van ongeveer 4 atmosferen na 9 dagen zuur geworden, terwijl de onbehandelde contrôlemelk na 30 uren was gestremd.

Bij proeven onder 12,5 atmosfeer koolzuurdruk waren de bacteriën in gepasteuriseerde melk bij 4,5° C na 24 dagen gestorven; ongepasteuriseerde melk bij 21° C was na 28 dagen bedorven. In het laatste geval was na 3 weken het aantal bacteriën reeds gestegen van 105.000 tot 48.000.000 en konden na 10 dagen reeds duidelijke smaakafwijkingen geconstateerd worden. Bij de proef met gepasteuriseerde melk werd waargenomen hoe na 3 weken de melk begon te veranderen. De caseïne begon tot fijne deeltjes samen te ballen en de smaak werd slechter. Daar het aantal bacteriën tot 0 terugliep, moet deze verandering wel aan de inwerking van het koolzuur op de melk worden geweten.

2. Zuurstofgas als conserveermiddel

Bij het procédé van HORIUS ter conserveering van melk en room wordt zuurstof onder druk gebruikt, gecombineerd met lage temperatuur.

Zuurstof kan ten opzichte van bacteriën geen indifferent gas genoemd worden. Bij aerobe bacteriën wordt de zuurstof in het stofwisselingsproces betrokken, waarbij bestanddeelen in den voedingsbodem geoxydeerd worden. Bij anaerobe bacteriën, waarvan de levensverschijnselen zijn ingesteld op afwezigheid van luchtzuurstof en die de zuurstof dus niet in hun normale levensfunctie gebruiken, is de aanwezigheid van zuurstof nadeelig. Een andere groep van bacteriën is ongevoelig voor het al of niet aanwezig zijn van zuurstof (melkzuurbacteriën bijv., die zoowel in aerobe als in anaerobe omstandigheden kunnen groeien), terwijl van bijv. colibacteriën aangenomen wordt, dat hun levensuitingen verschillend zijn bij aan- en afwezigheid van zuurstof.

Deze beschouwingen betreffen zuurstofdrukken tot 0,2 atmosfeer, daar in de natuurlijke atmosferische lucht de zuurstofdruk slechts 0,2 atmosfeer is. Men heeft zich echter reeds lang geleden afgevraagd of bij hogere zuurstofdrukken niet ook de aerobe of zelfs aerophile microben gevoelig voor zuurstof zullen zijn.

Reeds in 1904 deelde PORODKO (4) mee, dat bij zijn proeven, waarbij de bacteriën groeiden op het oppervlak van voedingsgelatine, *Bact. fluorescens liquefaciens* niet meer groeide bij een zuurstofdruk boven 1,94—2,51 atm. *Pen. glaucum*, een schimmel, evenzeer als *Bact. fluorescens liquefaciens* een typisch aerob microorganisme, groeide niet meer bij een zuurstofdruk boven 3,22—3,63 atm. Voor *B. subtilis*, *Proteus vulgaris* en *Bact. coli* vond hij als grens resp. 3,18—3,88, 3,63—4,35 en 4,09—4,84 atm. Bij deze proeven bleken de bacteriën niet gedood te zijn; *Bact. coli* en *Bact. fluorescens liquefaciens* bijv. waren na 14 dagen bij 8 à 9 atm. zuurstof nog levend.

MEYER (5) geeft voor den maximum zuurstofdruk, waarbij sporen nog kunnen kiemen, voor *Bac. mycoides* 0,96 atm. en voor *B. subtilis* 3,1 atm. op.

Deze proeven bewijzen, dat van zuurstof inderdaad een conserveerende werking te verwachten kan zijn ten opzichte van de werking van de in deze onderzoeken gebruikte bacteriën. Daar vele in melk aanwezige en in melk tot ontwikkeling komende bacteriën niet onderzocht zijn, kunnen deze proeven echter niet als voldoende voor het beoordeelen van de mogelijkheid van conservering op deze wijze beschouwd worden.

3. Vroegere onderzoeken over het Hofius-procédé

Het HOFIUS-procédé belooft een versch blijven der melk gedurende langer tijd dan bij bewaren onder normale omstandigheden. Hoewel wijde grenzen genoemd zijn, wordt de melk bij voorkeur bewaard bij een temperatuur van 5° C en een zuurstofdruk van 10 atmosferen.

Reeds van 1930 af zijn proeven genomen door anderen dan den uitvinder. Vele van deze proeven betreffen een eenvoudige vaststelling van den tijd, gedurende welke de melk nog goed blijft. Deze willen wij stilzwijgend voorbijgaan en wij zullen slechts die onderzoeken aanhalen, waarbij bacteriologische analyses verricht zijn.

Door de N.V. Metra werden afschriften beschikbaar gesteld van onderzoeken door het zuivelstation te Kiel.

Bij een proef met rauwe volle melk met een zuurgraad van 7° S.H. en 2.380.000 bacteriën, bewaard bij 2°—6° C, werd gevonden

Na	Contrôlemelk		Melk onder zuurstofdruk	
	S.H.	Bacteriën per ml	S.H.	Bacteriën per ml
0 dagen.	7,0	2.380.000	7,0	2.380.000
16 „		87.000.000	7,0	1.930.000
36 „	34,2	411.000.000	7,0	4.290.000
52 „			7,6	
94 „			8,6	

Bij deze proef was de zuurstofdruk niet opgegeven.

Men ziet hieruit, dat de bacteriën niet gedood werden. Evenmin veroorzaakte de zuurstof een groeiverhinderings, doch wel trad een sterke vertraging van den bacteriëngroei op. Ook valt bij deze proef de aandacht op een daling van het bacteriënaantal in de eerste 16 dagen. Na 36 dagen is de melk evenwel langzaam gaan bederven, zooals uit de titerstijging blijkt.

Bij een volgende reeks proeven werd slechts door bepaling van de hoeveelheid zuur nagegaan of en in hoeverre er veranderingen in de melk optraden.

Rauwe melk

Druk	Temperatuur	Aantal dagen	Titerstijging in S.H.	Geur
10 atm.	25°—26° C.	4	Van 6,2 tot 14,2	slecht
10 "	22°—24° C.	6	" 5,8 " 10,6	slecht
12 "	22°—24° C.	6	" 5,8 " 12,0	slecht
14 "	18° C.	3	" 5,2 " 11,6	
5 "	14°—15° C.	7	" 5,6 " 10,6	
5 "	10°—15° C.	16	" 5,7 " 10,4	
10 "	9°—10° C.	17	" 6,2 " 6,8	goed
10 "	3°—4° C.	63	" 6,4 " 6,7	
10 "	2,5°—5° C.	70	" 6,8 " 7,8	goed

Deze proeven geven den indruk, dat er in ieder geval, zelfs bij den hoogsten gebruikten druk, geen absolute conserveering te bereiken is. De proeven bij hooge temperaturen vertoonen een tamelijk snelle zuurvorming (doch in ieder geval sterk vertraagd ten opzichte van een bewaring zonder zuurstof) en naarmate de temperatuur van bewaren lager wordt, geschiedt het bederf langzamer. Beneden 5° C is het zelfs zóó langzaam, dat de melk na 2 maanden nog goeden geur had.

Soortgelijke proeven werden ook met gepasteuriseerde melk genomen.

Gepasteuriseerde melk

Druk	Temperatuur	Aantal dagen	Titerstijging in S.H.	Geur
10 atm.	25°—26° C.	4	Van 6,2 tot 14,2	slecht
10 "	22°—24° C.	6	" 5,8 " 10,5	slecht
12 "	22°—24° C.	6	" 5,8 " 12	slecht
14 "	22°—24° C.	4	" 6,2 " 32	
14 "	18° C.	3	" 5,2 " 11,6	
5 "	14°—15° C.	7	" 5,6 " 10,6	
5 "	10°—15° C.	16	" 5,7 " 10,4	
10 "	9°—10° C.	17	" 6,2 " 6,8	goed
10 "	2,5°—5° C.	70	" 6,0 " 7,8	
10 "	3°—4° C.	63	" 6,4 " 6,7	goed

Bij gepasteuriseerde melk werd dus hetzelfde resultaat als bij rauwe melk verkregen, hetgeen eenigszins verwondert. Bij een andere proef met rauwe melk werd n.l. geconstateerd, dat de flora onder de zuurstofatmosfeer voor 95 % uit zuurvormende bacteriën bestond. Daar deze bacteriën toch zeker geen sporevormers geweest kunnen zijn, moeten wij uit het gelijk verlopen der proeven in rauwe en gepasteuriseerde melk concluderen, dat de pasteurisatie niet voldoende geweest is.

Een volgende proef met rauwe melk werd genomen bij verschillende zuurstofdrukken en bij 8°—10° C.

Dagen	Gewoon bewaard		5 atmosferen		10 atmosferen	
	Bacteriën	S.H.	Bacteriën	S.H.	Bacteriën	S.H.
0	400.000	7,4	400.000	7,4	400.000	7,4
2	59.000.000	10,8	2.300.000	—	550.000	7,4
3	207.000.000	—	—	—	—	—
4	—	22,0	22.000.000	—	5.000.000	7,4
6	—	32,8	34.000.000	—	21.000.000	9
8	—	—	39.000.000	15,2	11.000.000	9,6

Ook hier is het bederf dus sterk vertraagd en wel meer naarmate de zuurstofdruk hooger is. De conclusie van HENNEBERG luidt, dat bij een zuurstofdruk van 10 atm. en bij temperaturen van 4°—5° C en 8°—10° C de vermeerdering der bacteriën volkomen tot stilstand komt of slechts buitengewoon langzaam voortschrijdt. Zelfs kon in de eerste dagen een achteruitgang van het kiemgetal waargenomen worden.

De onderzoekingen te Kiel zijn voortgezet, doch gaven niet zulke fraaie resultaten (6). De toegepaste zuurstofdruk was evenwel slechts 8 atmosferen, de temperatuur 3°—6° C. De melk bleef slechts 3 à 4 weken goed en ging daarna smaak- en geurgebreken vertoonen. Er was ook een sterke bacterievermeerdering, doch bij lang bewaren daalde het kiemgetal weer, bijv. een stijging tot 8.660.000 op den 28en dag en een daling tot 20.300 bacteriën op den 35en dag. Er werd gevonden dat het aantal colibacteriën minder werd, echter slechts langzaam. Bijv. na 28 dagen werd in melk, die oorspronkelijk een colititer van 10^{-3} had, een colititer van 10^{-2} gevonden.

In gepasteuriseerde melk waren de verschijnselen dezelfde, ook wat coli betreft. Ook bij deze proeven is de pasteurisatie dus niet betrouwbaar geweest.

Een derde onderzoek (7) brengt niet veel nieuwe gezichtspunten. Hierbij werd vooral de invloed van pasteurisatie, op verschillende wijzen uitgevoerd, nagegaan. Kiemgetallen werden hierbij niet bepaald. Uit titercijfers en smaakbeoordelingen blijkt, dat, indien zij op bepaalde manieren werd gepasteuriseerd de melk bij kamertemperatuur slechts langzaam zuurder werd, doch al spoedig een slechten (bitteren) smaak vertoonde.

Bij een onderzoek van VAN RAALTE werd eveneens de conserveerende werking van zuurstof onder hoogen druk geconstateerd, doch evenzeer een toename van bacteriën. Een zijner conclusies luidde, dat de melkzuurbacterie blijikbaar het sterkst in haar groei is geremd.

RICHTER (8) vermeldt, dat de colibacteriën na den derden dag afnemen en dat de melkzuurbacteriën in leven blijven.

RODENKIRCHEN (9) vond een sterke afname van coli, doch een sterke vermeerdering van andere bacteriën, zoowel in rauwe als in gepasteuriseerde melk. Na 3 weken begonnen smaakveranderingen op te treden.

Deze onderzoeken laten nog vele vragen onbeantwoord. Men krijgt den indruk, dat door de werking der zuurstof geen absolute conserveering verkregen wordt en dat er een zoodanig sterke vertraging van het melkbederf optreedt, dat men daardoor lang onder de grens van constateerbare afwijkingen blijft. Er is evenwel niet bestudeerd of inderdaad het melkbederingsproces onder den zuurstofdruk op dezelfde wijze, zij het dan in sterk vertraagden vorm, verloopt als onder gewone omstandigheden. Bij de besproken proeven is n.l. slechts geringe aandacht besteed aan de bacteriesoorten, zoodat de mogelijkheid bestaat, dat in de zuurstofmelk een zeer speciale flora optreedt, die men bij het gewone bederf niet aantreft. Daarom is ook een onderzoek, waarin alleen zuurgraadsveranderingen bepaald worden, onvolledig, daar men bij onbekendheid met de zich ontwikkelende flora niet kan weten of een titer- of pH-bepaling een goede maat is voor de voortschrijding van den bacteriengroei.

4. Wijze van proefneming

Voor de beoordeeling van een conserveeringsproces kan men twee wegen volgen. In de eerste plaats kan men onder practische omstandigheden nagaan hoe het proces verloopt, dus of en hoe de bacteriën zich vermeerderen en welke bacteriën eventueel tot ontwikkeling komen. In de tweede plaats kan men proeven nemen met reïncultures van bepaalde bacteriën om te bepalen hoe de verschillende bacteriesoorten zich bij de conserveeringsmethode gedragen. Deze tweede weg is bij het begin van een onderzoek niet aan te bevelen, omdat men van te voren niet kan weten, welke bacteriën speciaal voor een dergelijk onderzoek in aanmerking komen.

Wij zijn dus begonnen met de eerste methode en hebben de proeven genomen op dezelfde wijze als men de conserveering in de praktijk zal gebruiken. Deze proeven hebben duidelijke resultaten gegeven.

Speciaal de volgende vragen hebben onze aandacht gehad:

1. Is er in de onder zuurstofdruk bewaarde melk bacterieontwikkeling?
2. Welke zijn de bacteriën, die zich eventueel kunnen ontwikkelen?
3. Is de bacterieontwikkeling afwijkend van die van het normale melkbederf?
4. Is er ook vernietiging van bepaalde bacteriesoorten?

5. Welken invloed hebben temperatuur en zuurstofdruk op het proces?
6. Veranderen geur en smaak tijdens het bewaren?
7. Kan men van op deze wijze bewaarden room goede boter bereiden?
8. Welke is de invloed van pasteurisatie?

5. Techniek van het onderzoek

Alvorens wij tot het eigenlijke bacteriologisch onderzoek overgaan, willen wij eerst iets mededeelen over de wijze, waarop de proeven gedaan werden.

De voor de proeven benodigde lage temperatuur van onstreeks 4°C werd gevonden in een koelcel van de N.V. Hoornsche IJsfabriek. De temperatuur in deze cel was goed constant. Slechts bij groote weersveranderingen moesten bijzondere maatregelen genomen worden om daling of stijging te voorkomen. Daardoor kwamen enkele malen schommelingen voor, naar beneden tot $3\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$, naar boven tot 5°C , doch deze grootere variaties duurden slechts zeer kort en betroffen slechts de luchttemperatuur.

Van de gebruikte drukvaten waren er 3 van roestvrij staal, ons welwillend in bruikleen afgestaan door de N.V. Metra te Amsterdam; 3 andere waren van koper, van binnen zwaar vertind. Bij de proeven werd op sommige plaatsen de vertinning aangetast, doch dit had geen invloed op den smaak van de melk, daar deze dezelfde was als van de melk uit de stalen tanks.

De twee groote moeilijkheden, waarmede men bij een dergelijke apparatuur te kampen heeft, zijn de gasdichtheid en de steriliteit.

Aan de gasdichtheid worden zeer hooge eischen gesteld, omdat wij verlangden, dat een proef minstens 2 maanden kon duren. De dichting van kleine gaslekken heeft dan ook veel moeite en tijd gevergd, vooral bij de koperen tanks.

Bij de in hoofdstuk 3 besproken onderzoekingen is door de proefnemers weinig vermeld over de wijze van proefneming. In hoeverre infecties uitgesloten konden worden is daarom moeilijk te beoordeelen. Toch is het infectiegevaar, bijv. bij monsterneming, zeer groot.

Volkomen steriliteit is bij de in dit artikel besproken proeven nooit bereikt kunnen worden. Voor de gasdichte afsluiting is pakkingmateriaal noodig en hiervoor kon leder, fiber en op sommige plaatsen gummi gebruikt worden. Deze stoffen zijn moeilijk te steriliseeren, zeker niet bij hooge temperatuur, terwijl bij het in elkaar zetten van de onderdeelen weer nieuwe infectie optreedt.

Een tweede reden, die volmaakte steriliteit onmogelijk maakt, wordt gevormd door de aftapinrichtingen. Bij het aftappen van monsters tijdens een bewaarproef wordt dat gedeelte van de aftapinrichting, dat onder gewone luchtdruk staat, bevochtigd met melk en deze melk is uit de dieper gelegen

deelen niet volkomen te verwijderen, zoodat zij in gewoon bederf kan overgaan. Om dit te verhinderen, hebben wij na iedere monsterneming het uitwendige aftapmechanisme zoo goed mogelijk gereinigd met watten en ten slotte in de aftapopening een wat met 40 % formaline gebracht om bacterieontwikkeling te verhinderen. Bij een volgende monsterneming werd deze wat verwijderd, de opening gereinigd met droge watten en de eerst afgetapte hoeveelheid melk (0,5 à 1 liter) verwijderd. Deze methode heeft ons goed voldaan, hetgeen moge blijken uit de volgende proef.

Uit een proeftank werd na verwijderen van de formaline-wat en reinigen met droge watten 200 ml afgetapt en hierin het kiemgetal bepaald. Hierna werd 200 ml afgetapt, die niet onderzocht werd. Van de derde 200 ml werd het kiemgetal bepaald. De vierde 200 ml werd niet onderzocht en in de vijfde 200 ml werd wederom een bepaling van het kiemgetal uitgevoerd. Bij deze proef werden nu gevonden resp. 792.000, 740.000 en 764.000 bacteriën, terwijl in alle drie onderzochte monsters de bacterieflora volkomen dezelfde was. Ook bij vergelijkende monsters, genomen uit de kraan en met een pipet uit de tank, werd nooit eenig verschil in de bacterieflora gevonden. Dit bewijst dus, dat bij de genomen voorzorgen een infectie der monsters door de aftapinrichting niet te vreezen is.

Vóór het gebruik werden de vaten gesteriliseerd door ze te vullen met heet water en langdurig (15—20 minuten) stoom in te leiden. Ten slotte werd nog eenigen tijd in het ledige vat stoom geblazen. De koperen tanks hadden van dit procédé te veel te lijden, zoodat deze later gesteriliseerd werden met formalinedamp gedurende eenige dagen, gevolgd door een reiniging met verdund hypochloriet.

De melk voor de proeven, afkomstig van de Proefzuivelboerderij, werd afgekoeld tot de temperatuur, waarbij de proef genomen zou worden en dan in de tanks gegoten, waarna zij gevuld werden met zuurstof tot den gewenschten druk. Hierna werd de zuurstof afgeblazen en weer opnieuw met zuurstof gevuld, teneinde de oorspronkelijk boven de melk staande lucht te verwijderen.

De tanks werden iederen dag geschud om het oplossen van de zuurstof in de melk te bevorderen en oprooming te verhinderen. Na iedere monsterneming werd de druk wederom door bijvulling met zuurstof op de gewenschte waarde gebracht, daar door het aftappen een drukvermindering ontstaat.

Men kan zuurstofspanning op verschillende wijzen opgeven. In het volgende geven wij den druk aan in *atmosferen overdruk*, waarmede wij bedoelen het aantal atmosferen boven den normalen atmosferischen druk. Wij doen dit zóó, omdat de meeste manometers dezen overdruk rechtstreeks aangeven. Men bedenke dus, dat de werkelijke zuurstofdruk steeds 1 atmosfeer hooger is dan de vermelde overdruk.

6. Bacteriologische onderzoeksmethoden

Voor het bacteriologisch onderzoek werd een kleine hoeveelheid melk tot ongeveer 25° C verwarmd en eenige minuten aan zichzelf overgelaten, ten einde de melk vrij te maken van zuurstofbelletjes. Deze zouden n.l. het afmeten der juiste hoeveelheden melk met een gesteriliseerde pipet onmogelijk maken.

Het kiemgetal van de melkmonsters werd bepaald door verdunningen in 0,75 % NaCl-oplossing (gesteriliseerd) te mengen met gesmolten agar in cultuurschalen en deze gedurende 3 dagen bij 29° C te plaatsen. De gebruikte agar was Vleeschbouillonagar met ½ % pepton Witte en ½ % glucose (pH = 7). De glucose werd toegevoegd om een goede ontwikkeling van melkzuurbacteriën mogelijk te maken.

Deze bepalingen werden altijd in triplo gedaan om zooveel mogelijk onafhankelijk te zijn van de eigenaardigheden van deze telmethode. Gewoonlijk is als kiemgetal opgegeven het gemiddelde van de 3 tellingen, omgerekend op 1 ml, doch een enkele keer is het gemiddelde van 2 tellingen vermeld, als n.l. een der uitkomsten onbegrijpelijk ver van de andere afweek. Bij iedere telling werd steeds dezelfde hoeveelheid agar gebruikt, n.l. 20 ml in een cultuurschaal van 11,5 cm diameter.

Om een inzicht te krijgen in den aard der bacteriënflora werden oppervlaktecultures aangelegd op glucose-vleeschgelatine, waarop vele bacteriën karakteristieke kolonievormen vertoonen. Eventueel werden koloniën afgeënt en bacteriën in reïncultuur gebracht om nader bestudeerd te worden.

Het aantal colibacteriën of coliachtige bacteriën (ook *Bact. lactis aerogenes* rekenen wij hierbij) werd bepaald met de verdunningsmethode. Wij gebruikten hiervoor Durham-buisjes en als voedingsvloeistof den bodem van Mc. CONKEY met glucose en neutraalrood (pH = 7).

Eventuele zuurvorming, door bacteriën in de melk teweeg gebracht, werd bepaald door titratie van 50 g melk of room met n/10 NaOH en 5 druppels 3 %-phenolphthaleïne-oplossing als indicator. De bepaalde titers zijn alle opgegeven in ml n/10 per 100 g melk (of room). Wil men de titers uitdrukken in graden Soxhlet-Henkel, dan moeten de opgegeven getallen met 0,4 vermenigvuldigd worden.

7. Orienteerende proeven met melk en room

Op 10 Maart 1937 werd een koperen tank gevuld met 40 liter rauwe versche volle melk en onder 9 à 9½ atmosfeer zuurstofoverdruk bewaard bij 4°—5° C.

In tabel 1 wordt het verloop van het aantal bacteriën en den zuurgraad opgegeven.

TABEL 1

	Melk onder 9—9½ atm. zuurstof		Contrôlemelk, gewoon bewaard	
	Kiemgetal	Titer	Kiemgetal	Titer
Bij vulling	65.000	17,6	65.000	17,6
Na 2 dagen	345.000	18,0	18.000	18,2
" 6 "	43.000	18,2	420.000	18,2
" 12 "	3.800	17,2	181.000.000	25,4
" 20 "	7.100	17,8	—	52,6
" 27 "	47.600	18,0		
" 34 "	186.000	18,2		
" 41 "	331.000	17,4		
" 48 "	355.000	18,2		
" 55 "	220.000	18,6		
" 62 "	200.000	18,0		
" 69 "	172.000	18,4		

In figuur 1 is het verloop van het aantal bacteriën en den zuurgraad met den tijd grafisch voorgesteld, waarbij de punten der bepalingen door rechte lijnen verbonden zijn. Op de verticale as is evenwel niet het aantal bacteriën afgezet, doch de logarithme van het aantal.

De tabel en de figuur geven een duidelijk beeld van het verloop van het aantal bacteriën. Zien wij af van de sterke toename van het aantal bacteriën bij de eerste monsterneming, waarvan wij in hoofdstuk 13 een verklaring zullen geven, dan zien wij, dat het bacterieel proces in de zuurstofmelk bij deze proef uit 3 duidelijk onderscheiden fasen bestaat, die wij in het volgende de 1ste, 2de en 3de phase zullen noemen. Deze zijn:

1. Een phase, waarbij de bacteriën voor een groot deel gedood worden. Bij de proef duurde deze phase 12 dagen en aan het einde bedroeg het aantal bacteriën nog slechts 6 % van het in het begin aanwezige aantal of 1,1 % van het na 2 dagen getelde bacterieaantal.

2. Een phase van bacteriegroei, welke langzaam begint, steeds sneller wordt en daarna weer in snelheid afneemt. Deze phase duurde in de proef 36 dagen. Bij het maximum was, vergeleken met de verse melk, het aantal bacteriën tot 550 % gestegen en vergeleken met het laagst bereikte punt, tot 9.350 %.

3. Een phase van ongeveer constant of zelfs dalend bacteriegehalte. Blijkbaar is na 48 dagen bewaren een (eenigszins schommelend) evenwicht bereikt.

De bacterietoename in de 2de phase is betrekkelijk gering, doch duidelijk blijkt, dat bij de omstandigheden der proef geen stilstand der bacterieont-

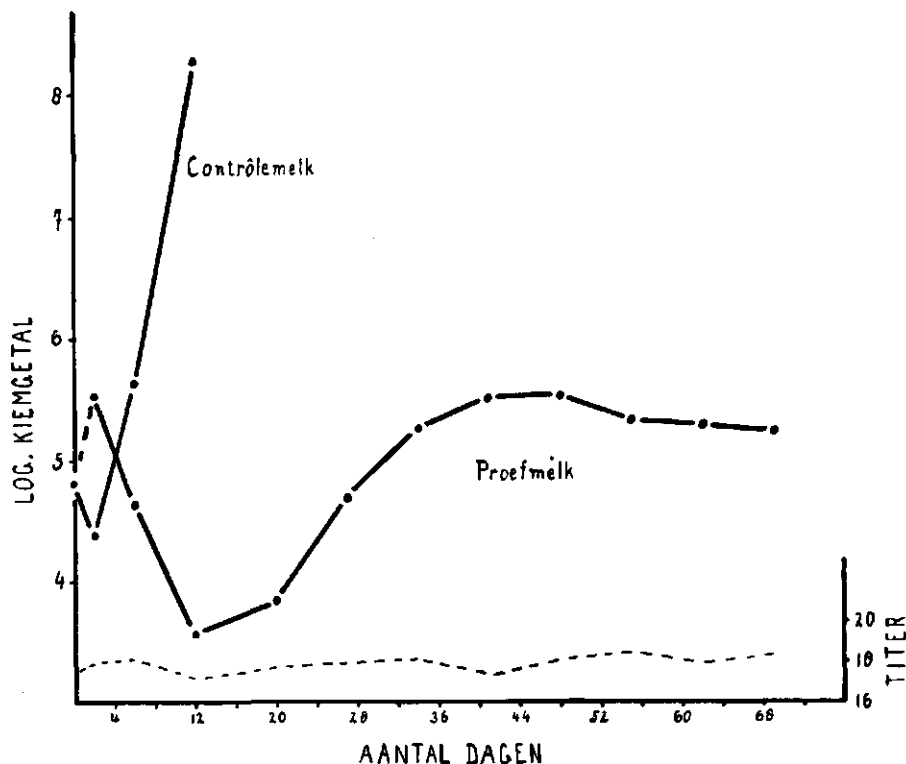


Fig. 1

Melk onder 9 atm. zuurstofoverdruk bij 4°—5° C

wikkeling is ingetreden. Vergeleken met de contrôlemelk, is deze groei inderdaad zeer langzaam. Bij de contrôlemelk is het bacterieel proces in 2 fasen verlopen, n.l. eerst een kleine vermindering, dan gevolgd door een zeer snelle toename.

De titercijfers der zuurstofmelk geven geen beeld van het hierboven geschetste verloop. Niettegenstaande de bacterievermeerdering tot 355.000 kiemen, is de titer ongeveer constant gebleven.

In een tweede proef, genomen met room en begonnen op 24 Maart 1937, werd eenzelfde resultaat verkregen. De room bevatte ongeveer 20 % vet en de toegepaste overdruk was 9½ à 10 atmosferen. Temperatuur 4°—5° C. Zie tabel 2.

TABEL 2

	Room onder $9\frac{1}{2}$ —10 atm. zuurstof		Contrôleroom, gewoon bewaard	
	Kiemgetal	Titer	Kiemgetal	Titer
Bij vulling	23.400	—	23.400	—
Na 6 dagen	16.000	16,6	1.950.000	17,2
" 13 "	18.500	17,4	50.000.000	24,6
" 20 "	109.000	17,8		
" 27 "	427.000	17,2		
" 34 "	446.000	18,0		
" 41 "	496.000	18,2		
" 48 "	300.000	18,4		
" 55 "	170.000	18,2		
" 65 "	217.000	18,4		
" 80 "	517.000	18,2		
" 87 "	447.000	18,4		

De gegevens zijn op dezelfde wijze als van tabel 1 grafisch voorgesteld in figuur 2.

Daar de eerste monsterneming pas na 6 dagen geschiedde, komt in de cijfers van deze proef de sterke toename, die bij de eerste proef na 2 dagen gevonden werd, niet tot uiting, doch overigens is het proces op dezelfde wijze verlopen als in de eerste proef.

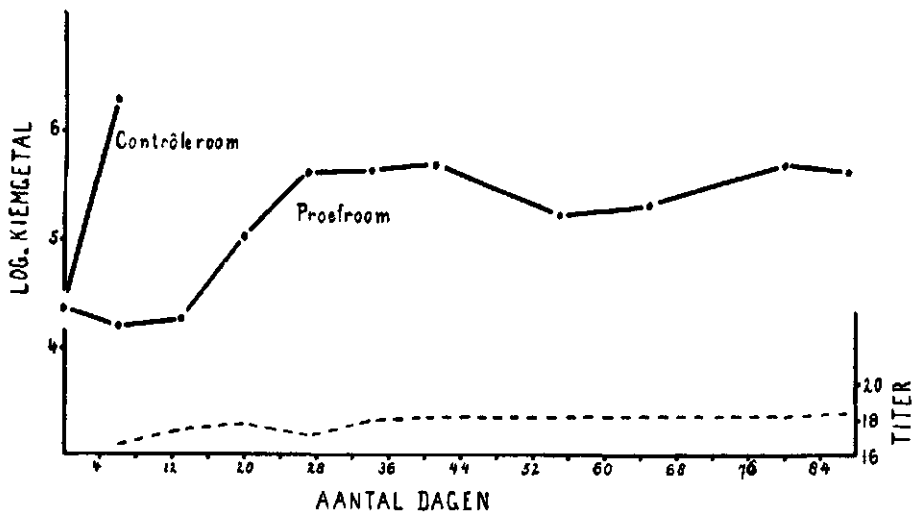


Fig. 2

Room onder $9\frac{1}{2}$ atm. zuurstofoverdruk bij 4° — 5° C

Dit ingewikkelde proces van zoo typischen aard doet veronderstellen, dat in de melk onder zuurstofdruk verschijnselen optreden, die niet maar

eenvoudig aangeduid kunnen worden met de uitdrukking „vertraagd bederf”.

De studie van de microbenflora heeft bevestigd, dat zich inderdaad in de zuurstofmelk andere processen afspelen dan in gewoon bewaarde melk.

De bij dezelfde temperatuur op gewone wijze, dat is dus in een vat, waarin de melk zich onder den gewonen luchtdruk bevindt, bewaarde melk vertoont een tamelijk snel bederf. Door de lage temperatuur van 5° C duurt het wel veel langer dan bij kamertemperatuur eer de melk ongenietbaar geworden is, doch bij de proef van tabel 1 was de melk tussehen 6 en 12 dagen totaal bedorven. Het bederf in deze contrôlemelk wordt teweeg gebracht door eiwit-aantastende bacteriën, n.l. bacteriën, waarvan de koloniën de gelatine doen vervloeien. Naast deze vervloeiende bacteriën vindt men in de contrôlemelk ook zeer veel coliachtige bacteriën. De oorspronkelijke flora der versehe melk bestaat uit chromogene bacteriën, zwak vervloeiende bacteriën en melkzuurbacteriënachtige soorten. Soms ook vindt men op de cultuurplaten colikoloniën. Deze flora wijzigt zich bij het gewone bederf dus totaal ten voordeele van vervloeiende en coliachtige bacteriën. Na een aanvankelijke daling van het bacteriegehalte, welke alle soorten gelijkelijk schijnt te treffen en welke mogelijk door bactericide stoffen der melk veroorzaakt wordt, volgt dus de snelle stijging van de genoemde twee bacteriesoorten, die de melk doet bederven.

Bij de zuurstofmelk verloopt het proces geheel anders. Als we afzien van de sterke bacterietoename, gevonden bij de monsterneming na 2 dagen, valt in het bijzonder op, dat in de eerste phase, d.i. de phase, waarin het aantal bacteriën vermindert, de flora veel gelijkenis blijft vertoonen met die der versehe melk. Dit wil dus zeggen, dat de zuurstof onder den hoogen druk, die bij de proef gebruikt werd, een schadelijken, zelfs doodenden invloed heeft op de bacteriën, die in de versehe melk voorkomen. Deze vernietigende invloed treft de verschillende bacteriesoorten in ongeveer gelijke mate. Na 12 dagen, toen het aantal bacteriën tot 3.800 gedaald was, was de flora nog vrijwel gelijk aan die der uitgangsmelk.

In de 2de phase treedt evenwel een algeheele omvorming der flora in. Het aantal kleine koloniën op de platen neemt dan sterk toe. Op den 27sten dag was nog slechts een enkele chromogene bacterie aanwezig, doch op den 34sten dag en later kon de flora een reincultuur van deze kleine koloniën vormende bacterie genoemd worden. Deze reincultuur is echter slechts schijnbaar, omdat door de toegepaste groote verdunning bij het maken van de plaatcultures de andere soorten door hun naar verhouding gering aantal niet meer op de platen verschijnen.

Deze op natuurlijke wijze ontstane schijnbare reincultuur is er een van bacteriën, die de gelatine niet vervloeien. Het zijn duplococcen, die geen katalase bevatten en dus tot de groep der melkzuurbacterien behooren. Het

zuurvormend vermogen is echter zeer gering. Bij 21° C stremmen zij de melk pas na ongeveer 14 dagen.

Hieruit zien wij dus, dat het ontwikkelingsproces der bacteriënflora in de zuurstofmelk volkomen afwijkt van het normale bederf van melk. De oorspronkelijke flora der melk, waaronder de bacteriën, die het normale bederf veroorzaken, sterft af. De zuurstofmelk biedt slechts mogelijkheid voor de ontwikkeling van een bepaalde bacteriesoort.

Als gevolg van dit onderzoek naar de ontwikkeling van de bacteriënflora kunnen wij thans ook den typischen vorm der bacterielijn van fig. 1 en 2 en het verschijnsel der 1ste en 2de phase verklaren. Deze bacterielijn is n.l. de combinatie van een afstervingslijn en een groeilijn. De flora, die oorspronkelijk in de verse melk aanwezig was, of, als wij de sterke verhooging van het bacteriaantal na 2 dagen mede in rekening brengen, de flora, zooals die na 2 dagen in de melk bestond, sterft af in de zuurstofomgeving volgens een gewone afstervingslijn. Deze is in figuur 3 geteekend als de lijn A en stelt dus

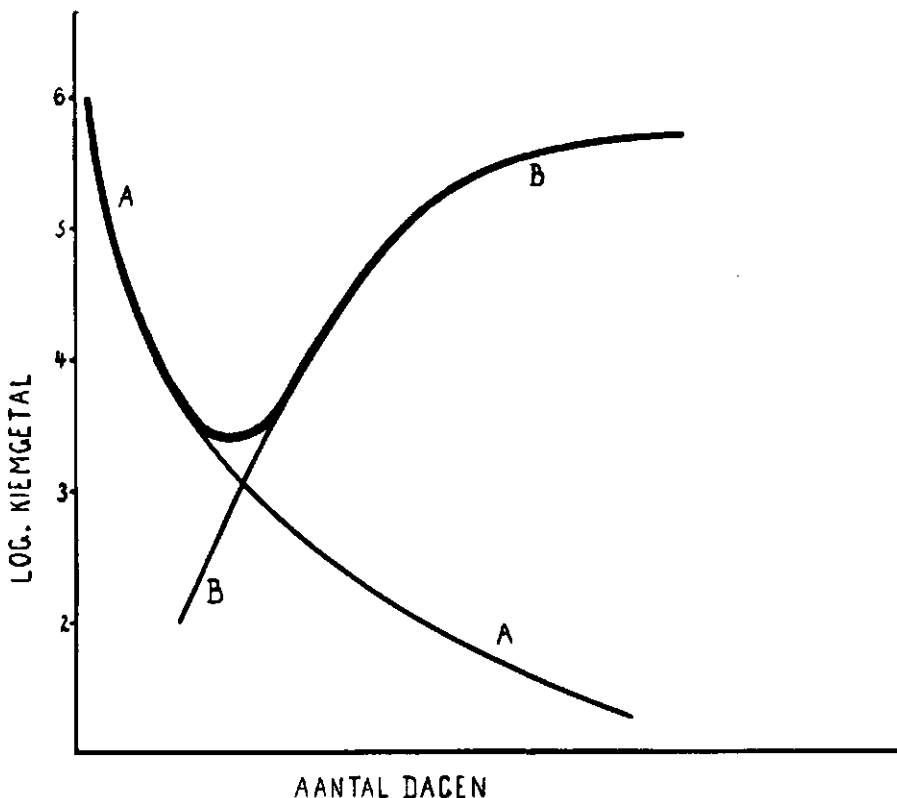


Fig. 3

Verloop van het kiemgetal, samengesteld uit een afstervingslijn A en een groeilijn B

voor het aantal bacteriën, dat van de oorspronkelijke flora op ieder tijdstip nog aanwezig is. Tegelijkertijd heeft er groei plaats van de bovengenoemde bacteriën uit de groep der melkzuurbacteriën. Deze flora groeit volgens de gewone voor groeiprocessen bekende S-lijn. De lijn B stelt voor het aantal bacteriën van deze „zuurstofflora”, dat op ieder tijdstip aanwezig is. Het totaal resultaat der bacterietelling wordt voorgesteld door de sommeering van A en B. Dit is de dikke lijn, die verloopt als de lijn van figuur 1.

8. Invloed van de grootte van den zuurstofdruk

Met de 3 stalen tanks werd op 19 Mei 1937 een proef aangevangen, waarbij de melk (versche rauwe volle melk) in ieder der tanks onder een anderen zuurstofdruk bewaard werd. De bewaartemperatuur was wederom 4°—5° C en de gebruikte overdrukken waren 5, 8 en 10½ atmosfeer.

Het resultaat van de proef wordt vermeld in tabel 3.

TABEL 3

Aantal bacteriën per ml

	Contrôle-melk	Melk, bewaard onder zuurstof-overdruk van		
		5 atm.	8 atm.	10,5 atm.
Bij vulling	15.500	15.500	15.500	28.800
Na 2 dagen	33.000	188.000	186.000	255.000
„ 5 „	5.220.000	55.000	55.000	106.000
„ 8 „	42.000.000	6.000	7.000	25.300
„ 12 „	36.200.000	23.400	2.800	9.600
„ 16 „	—	327.000	2.500	4.100
„ 20 „	—	2.127.000	6.300	1.600
„ 27 „	—	9.200.000	65.200	2.800
„ 33 „	—	10.300.000	351.000	8.600
„ 41 „	—	18.300.000	675.000	52.700
„ 48 „	—	—	740.000	202.000
„ 55 „	—	15.100.000	720.000	450.000
„ 62 „	—	9.100.000	445.000	256.000
„ 70 „	—	6.800.000	229.000	172.000

Bij deze proef werd in alle bewaarovaten melk uit dezelfde portie gedaan. Het hoogere aanvangskiemgetal van de melk, welke onder 10,5 atm. bewaard werd, is veroorzaakt doordat deze melkhoeveelheid iets later gekoeld werd dan de andere.

De resultaten zijn in figuur 4 grafisch voorgesteld.

De lijnen ,die het bacteriënaantal voorstellen, vertoonen volkomen hetzelfde beeld als in de figuren 1 en 2. We zien hier, dat bij hooger en zuurstofdruk:

1. het bacteriëmaximum later bereikt wordt,
2. het bacteriëmaximum lager ligt,
3. in de 2de phase (d.i. de groei vóór het bereiken van het maximum) de groei langzamer geschiedt,
4. het bacteriëminimum lager ligt en
5. het bacteriëminimum later bereikt wordt.

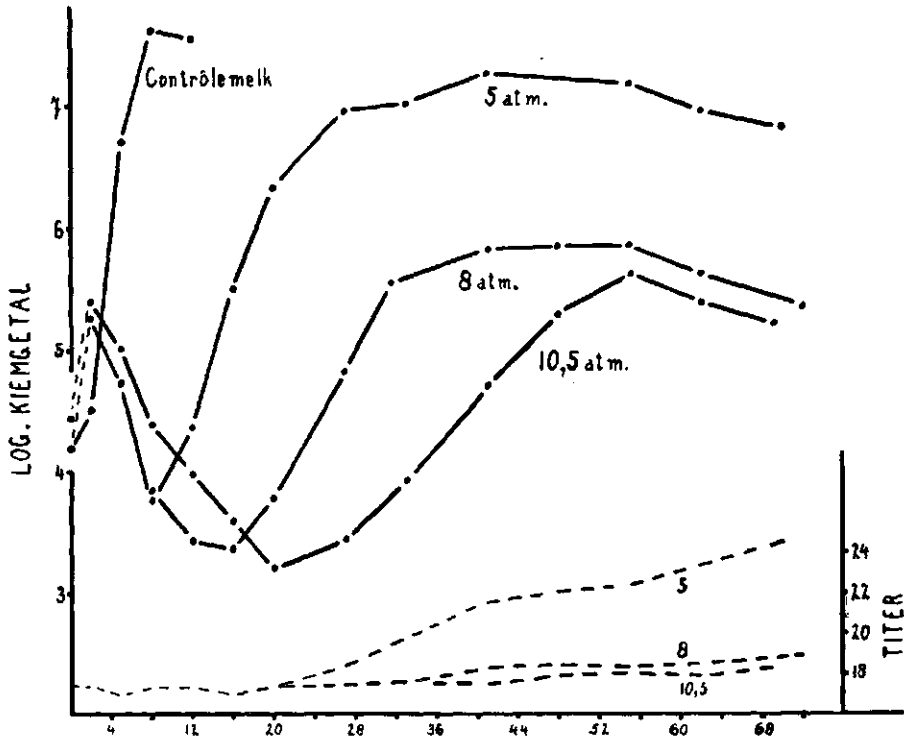


Fig. 4

Melk bij 4°—5° C onder verschillenden zuurstofoverdruk

Het onderzoek naar de in de tanks aanwezige bacteriesoorten leverde hetzelfde resultaat op als bij de eerste proeven. In alle 3 tanks werd een afsterven der oorspronkelijke hoofdflora waargenomen, terwijl in de 2de phase een sterke groei optrad van dezelfde melkzuurbacteriën als bij de proeven van tabel 1 en 2. Er was echter in zooverre eenig verschil aanwezig, dat in de tanks van 5 en 8 atmosferen zich nog een tweede soort melkzuurbacteriën ontwikkeld had, hoewel in geringe mate. Deze soort, ook katalasenegatief, stremde de melk bij 21° C zelfs niet na 16 dagen.

Het resultaat van deze proefreeks is volkomen te verklaren uit de opvatting, waartoe wij in het vorige hoofdstuk kwamen. De verschillende resultaten bij verschillende druk worden veroorzaakt door de afhankelijkheid van den groei der „zuurstofflora” van den zuurstofdruk. De hierbij betrokken melkzuurbacteriën vereischen voor hun ontwikkeling de zuurstofatmosfeer niet, want zij groeien ook zeer goed bij den gewonen druk der lucht. Zij zijn echter veel minder gevoelig voor zuurstof dan de andere bacteriën. Ook zij worden door de zuurstof geschaad, doch de schadelijkheid der zuurstof betreft voor hen bij de toegepaste drukken slechts de ontwikkelingssnelheid, die geringer wordt naarmate de zuurstofdruk hooger is. De snellere groei bij lagere zuurstofspanningen is oorzaak, dat de groeilijn B van figuur 3 meer naar links opschuift en steiler wordt. Dit is voorgesteld in figuur 5, waarin lijn A wederom de afstervingslijn is. De lijnen B, C en D zijn de groeilijnen der zuurstofverdragende duplococcen; B voor den lagen druk, C en D voor de hoogere drukken.

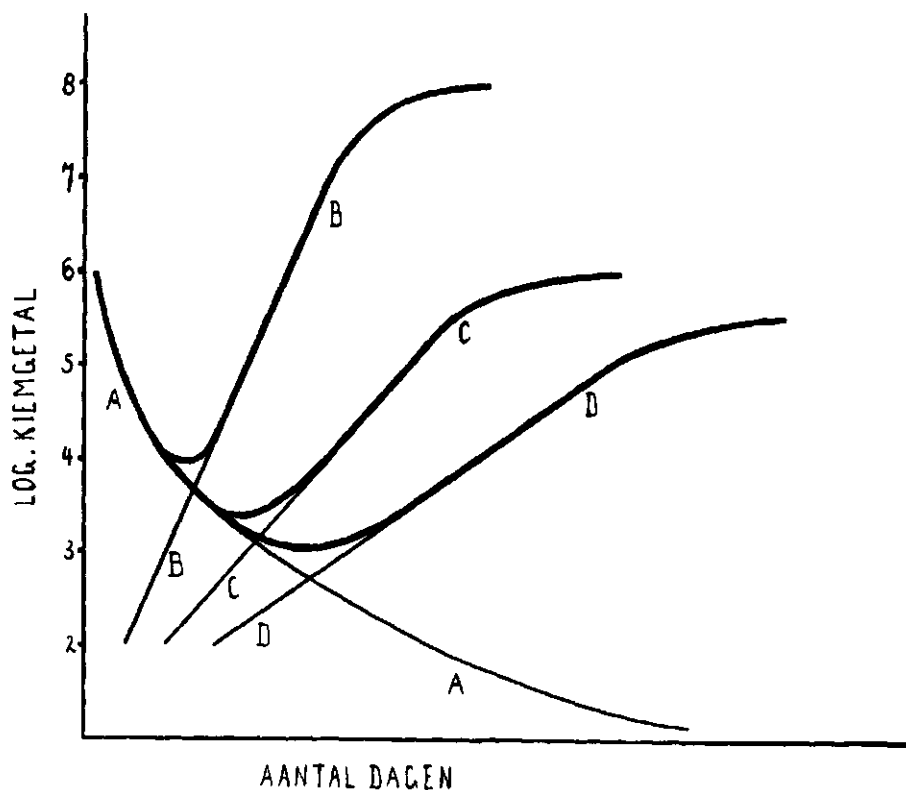


Fig. 5

Verloop van het kiemgetal door verschil in groeisnelheid bij verschillende zuurstofdruk

Hiermede is tevens het lagere en latere minimum bij hooger en druk verklaard.

De groeilijn vertoont nog een tweede afhankelijkheid van de grootte van den zuurstofdruk. Uit de proef van tabel 3 volgt n.l., dat het maximum aantal bacteriën hooger wordt naarmate de zuurstofdruk lager is. Wij willen dit maximum aantal het „plafond” noemen.

Het plafond wordt dus door den zuurstofdruk bepaald. De verschillende ligging van het plafond is in figuur 5 eveneens in aanmerking genomen.

De duplococci der zuurstofflora zijn slechts uiterst zwakke zuurvormers. Dit blijkt ook uit de cijfers voor de zuurvorming in de tanks. Na iedere monsterneming is de melk getitreerd en een extract der titercijfers is gegeven in tabel 4.

TABEL 4

Titer der melk in ml n/10 per 100 g

	Contrôle	5 atm.	8 atm.	10,5 atm.
Versch	17,4	17,4	17,4	17,4
Na 5 dagen	17,4	17,0	17,4	17,2
„ 12 „	23,3	17,4	17,4	17,0
„ 20 „	—	17,4	17,4	17,2
„ 33 „	—	19,8	17,6	17,6
„ 48 „	—	22,2	18,6	18,0
„ 62 „	—	23,4	18,6	18,0
„ 70 „	—	24,6	19,0	18,4

Deze titercijfers zijn in figuur 4 opgenomen en het verloop ervan is aangegeven door streeplijnen.

Bij de melk onder 8 en 10,5 atm. zuurstofoverdruk is er nauwelijks van eenige titerverhoging sprake. Het aantal bacteriën hierin was dan ook nog geen miljoen. Bij 5 atmosfeeren is er een duidelijke zuurvorming, doch ook deze zuurvorming is nog vrij gering. Eigenlijk begint de zuurvorming pas merkbaar te worden als het aantal bacteriën het miljoen overschreden heeft.

Bij de hoogere zuurstofdrukken geeft de bepaling van den zuurgraad dus geen inzicht of bacteriegroei is opgetreden of niet.

9. Proeven bij lagen zuurstofdruk

In hoofdstuk 7 en 8 hebben wij gezien van hoe grooten invloed de zuurstofdruk op de bacterieflora der melk is. Zelfs bij een druk van 5 atmosferen komt bij 4°—5° C de flora van het normale bederf niet meer tot ontwikkeling en sterft zelfs af.

De vraag was nu, bij welken zuurstofdruk de grens ligt tusschen het normale bederf en de ontwikkeling van de typische zuurstofflora. Op deze vraag is een eenvoudig antwoord niet te verwachten, daar bij het normale bederf verschillende bacteriesoorten zijn betrokken en voor deze verschillende soorten de critische zuurstofdruk, waarboven een afsterven optreedt, verschillend kan zijn.

Het resultaat van het onderzoek bij lage zuurstofspanningen kan ook niet van te voren voorspeld worden uit de theoretische beschouwingen bij figuur 5, daar de toestand sterk verandert als de afstervingslijn A een geheel anderen vorm krijgt of bij den lagen druk zelfs tot een groeilijn wordt.

De proef werd begonnen op 14 December 1937 en uitgevoerd in de vertind koperen tanks. De gebruikte zuurstofoverdrukken waren 1, 2 en 3,5 atmosfeer. Alvorens de tanks definitief op de vereischte zuurstofspanningen te brengen, werd de lucht, boven de melk staande, verdreven door zuurstof in de tanks te persen tot de bedoelde drukken, gevolgd door afblazen van het gasmengsel en dit eenige malen te herhalen.

De gegevens over bacterieaantallen en titers vindt men in tabel 5. De temperatuur, waarbij de proef werd uitgevoerd was 4°—5° C.

TABEL 5

		Rauwe versehe volle melk onder een zuurstofoverdruk van					
		1 atmosfeer		2 atmosferen		3,5 atmosferen	
		Kiemgetal	Titer	Kiemgetal	Titer	Kiemgetal	Titer
Bij vulling		24.400	17,4	24.400	17,4	24.400	17,4
Na 1 dag		55.000	17,4	80.000	17,2	102.000	17,4
„ 2 dagen		33.000	17,4	45.000	17,4	66.000	17,4
„ 3 „		20.000	17,4	—	—	—	—
„ 4 „		12.700	17,4	21.600	17,4	34.300	17,4
„ 6 „		19.000	17,4	13.300	17,2	12.200	17,2
„ 8 „		21.000	17,4	—	—	11.200	17,0
„ 10 „		55.000	17,4	13.000	17,4	10.000	17,4
„ 13 „		184.000	—	26.000	17,2	10.000	17,2
„ 16 „		627.000	18,0	60.000	17,8	13.200	17,4
„ 20 „		7.700.000	19,0	362.000	17,4	40.000	17,2
„ 24 „		61.600.000	19,8	2.860.000	17,8	142.000	17,2
„ 30 „		358.000.000	31,4	22.500.000	19,6	1.550.000	18,0
„ 36 „		—	—	43.000.000	23,0	9.400.000	19,2
„ 43 „		—	—	48.000.000	24,6	18.400.000	21,4

Deze cijfers zijn in figuur 6 op dezelfde wijze als vroeger grafisch voorgesteld. Wij zien hieruit, dat het verloop van het aantal bacteriën hetzelfde

is als bij hogere drukken. De toename van het aantal bacteriën in de tweede phase geschiedt bij deze lage zuurstofdrukken nog zeer langzaam. De invloed van de zuurstof is dus wel zeer groot. De 3 lijnen van figuur 6 kunnen wij echter niet uit één gezichtspunt bekijken, daar in de 3 tanks niet dezelfde bacteriesoorten gingen groeien.

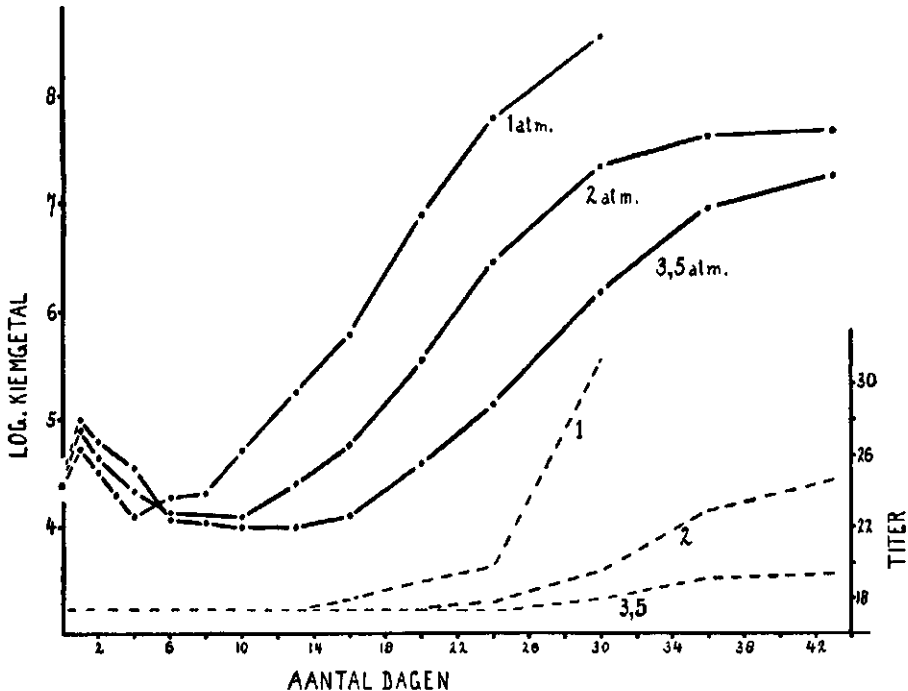


Fig. 6

Melk bij 4°—5° C onder verschillenden zuurstofoverdruk

In de tank van 1 atmosfeer zuurstofoverdruk bleef de oorspronkelijke melkflora gedurende de eerste week bewaard. Na 8 dagen begonnen zich tekenen van verandering kenbaar te maken en na 10 dagen bestond de flora bijna uitsluitend uit gelatine-vervloeiende bacteriën. In de daarop volgende dagen namen ook de coliachtige bacteriën toe en ging het aantal vervloeiende bacteriën weer langzaam terug, zoodat bij het einde der proef de flora bijna uitsluitend uit coliachtige bacteriën bestond, waarnaast enkele vervloeiende en enkele melkzuurbacteriën van zwak zuurproduceerend vermogen aanwezig waren.

Onder deze omstandigheden hebben wij dus geen ophooping van wat wij hierboven de „zuurstofflora” noemden, gekregen.

In de tank van 2 atmosferen zuurstofoverdruk was na 13 dagen nog veel van de oorspronkelijke melkflora in leven. Pas na 16 dagen begon het duidelijk zichtbaar te worden, dat de flora zich ging wijzigen ten gunste van een bepaald type van bacteriën. Deze bacteriën, wederom zwakzurende melkzuurbacteriën, namen hierna snel in aantal toe, doch tot aan het einde der proef werden op de gelatineplaten tusschen deze steeds enkele coliachtige en vervloeiende bacteriën (en wel coliachtige in sterkere mate dan de vervloeiende) gevonden. In verband met de bij de toename van het totaal aantal bacteriën passende grootere verdunning, die voor het maken der plaatcultures gebruikt werd, moeten we dus concludeeren, dat ook coliachtige en vervloeiende bacteriën onder dezen druk nog groei vertoond hadden.

In de tank met 3,5 atmosfeer zuurstofoverdruk stierven in de eerste 14 dagen uit de oorspronkelijke melkflora voornamelijk de chromogene en vervloeiende bacteriën af en weldra gingen wederom de zwakzurende melkzuurbacteriën groeien, zoodat aan het einde de flora geheel uit types van deze bacteriën bestond.

Uit deze proef blijkt dus wel, dat bij 4°—5° C van een sterken groei van vervloeiende bacteriën bij een zuurstofoverdruk hooger dan 1 atmosfeer geen sprake meer is. Voor coliachtige bacteriën lag de grens in deze proeven bij ongeveer 2 atmosferen.

Een vergelijking met de proeven bij hooger en druk (tabel 3) is niet goed mogelijk, daar wij den indruk kregen, dat bij den lageren zuurstofdruk toch niet dezelfde melkzuurbacteriën tot ontwikkeling kwamen als bij hoogen druk.

Hoewel dus reeds bij lagen zuurstofdruk een groote vertraging in den bacteriegroei geconstateerd wordt, zijn deze lage drukken toch niet voldoende om een goede conserveering te verkrijgen. De melk onder 1 atmosfeer overdruk was na 20 dagen door de coliachtige en de vervloeiende bacteriën bedorven. Voornamelijk de geur was slecht.

Smaak- en geurafwijkingen werden in de melk met 2 atmosferen overdruk na 16 dagen waargenomen, doch, zooals ook wel uit den aard der flora volgt, was de geur ook aan het einde van de proef niet bedorven, zooals dit bij zonder zuurstof bewaarde melk het geval zou zijn geweest. De karakteristiek was: iets zurig, esterachtig, slijmig.

Bij de melk onder 3,5 atmosfeer zuurstofoverdruk werd „iets esterachtig” geconstateerd na 30 dagen, waarna smaak en geur sterker achteruitgingen.

Opvallend was bij deze laatste 2 tanks de sterke kookvertraging, waardoor de melk niet normaal gekookt kon worden. Waarschijnlijk is hierop de slijmige structuur der bewaarde melk van invloed geweest. Juist dit optreden van een geringe slijmigheid bij eenzelfde aantal bacteriën als in de proef met 5 atmosferen zuurstofoverdruk, in welke melk niet een dergelijke afwijking werd geconstateerd, maakt het sterk waarschijnlijk, dat hierbij niet dezelfde melk-

zuurbacteriënflora in het spel was. Uit de titercijfers blijkt echter, dat er geen groote verschillen in de zuurvormende eigenschappen dezer melkzuurbacteriën zijn.

10. Toepassing van hooger en zuurstofdruk

Zooals wij zagen, is het gevolg van hooger en zuurstofdruk een later optreden der groeifase (2de fase) en een lager plafond. Verhoogen wij dus den zuurstofoverdruk tot een nog hoogere waarde dan de in de proef van hoofdstuk 8 gebruikte 10,5 atmosfeer, dan zou verwacht kunnen worden, dat de groeifase zich naar nog later tijd zou verplaatsen en het „plafond” nog lager zou zijn. De proeven, welke wij hierover genomen hebben, leidden nog niet tot een geheel duidelijk resultaat. Twee proeven, een met melk en een met room, beide versch en rauw in de tanks gedaan, de melk in een vertind koperen, de room in een stalen tank, genomen bij 11 atmosfeer zuurstofoverdruk, gaven zelfs een zoodanige verschuiving, dat de tweede (de groei-) fase binnen den duur dezer proeven niet begon.

In tabel 6 vindt men de gegevens van deze proeven. De proef met melk werd ingezet op 17 Augustus 1937 en de proef met room op 6 Augustus 1937. Temperatuur 4°—6° C.

TABEL 6

	Proef met rauwe melk				Rauwe room 11 atm. zuurstof- overdruk	
	Gewoon bewaard		11 atm. zuurstof- overdruk			
	Kiemgetal	Titer	Kiemgetal	Titer	Kiemgetal	Titer
Bij vulling	14.000	17,0	14.000	17,0	130.000	—
Na 1 dag	16.300	17,0	513.000	16,8	—	—
„ 2 dagen	11.300	16,8	372.000	16,8	—	—
„ 3 „	19.000	16,8	137.000	16,8	—	—
„ 4 „	112.000	16,8	72.700	17,2	—	—
„ 6 „	34.700.000	16,8	9.000	17,2	—	—
„ 10 „	—	—	3.600	17,0	—	—
„ 13 „	—	—	1.700	17,0	—	—
„ 16 „	—	—	1.600	17,0	—	—
„ 20 „	—	—	600	17,2	—	—
„ 27 „	—	—	90	17,4	—	—
„ 34 „	—	—	70	18,0	—	—
„ 35 „	—	—	—	—	4.000	20,2
„ 42 „	—	—	—	—	3.800	20,6
„ 43 „	—	—	57	17,8	—	—
„ 52 „	—	—	—	—	1.800	20,6
„ 59 „	—	—	14	18,2	—	—
„ 72 „	—	—	12	18,4	—	—
„ 75 „	—	—	—	—	83	21,2
„ 107 „	—	—	16	18,4	—	—

De resultaten van de proef met melk zijn grafisch voorgesteld in figuur 7 en de verkregen lijn stelt dus eigenlijk niets anders voor dan de afstervings-

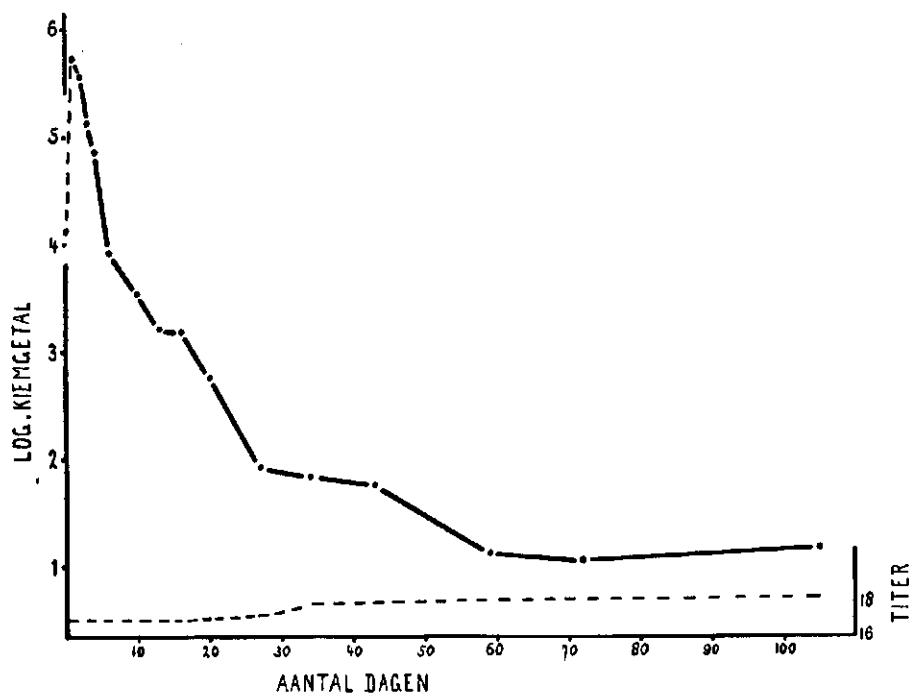


Fig. 7

Proef, waarbij geen groei der zuurstofflora optrad. Afstervingslijn

kromme van de normale melkflora, dat is dus de lijn A in figuur 3. Ook uit het onderzoek van de aanwezige bacteriën bleek, dat hier slechts sprake was van een langzaam afsterven der oorspronkelijke flora, want nog na 20 dagen werden enkele vervloeiende bacteriën en een aantal melkzuurbacteriën gevonden. Later dan 20 dagen was het aantal bacteriën zóó gering, dat een analyse der aanwezige soorten te onbetrouwbaar werd om uit te voeren.

Hoewel dus bij deze proeven bij 11 atmosferen geen bacteriegroei meer optrad, is in een latere proef bij 12 atmosferen zuurstofoverdruk nog wel groei geconstateerd, doch waarschijnlijk ligt de ontwikkelingsgrens der „zuurstofflora” wel ongeveer bij dezen druk, ten minste bij de temperatuur van 4°—5° C en binnen het tijdsverloop van 2 maanden.

11. De invloed van zuurstof bij verschillende temperaturen

Nu wij gezien hebben, dat zuurstof onder druk een grooten invloed heeft op de bacteriën der melk bij 4°—5° C, willen wij thans nagaan of dit bij hogere

temperaturen ook het geval is. In het bijzonder leek het van belang te weten of de zuurstof ook bij hogere temperatuur een gansch andere floraontwikkeling als in onder normale omstandigheden bewaarde melk zou veroorzaken.

Er zijn 2 proeven genomen met rauwe verse melk, n.l. een met 11 atmosferen zuurstofoverdruk bij 19° C en een met 10 atmosferen zuurstofoverdruk bij 9½ à 10° C. Voor de eerste dezer twee proeven werd een vertind koperen, voor de tweede een stalen tank gebruikt.

De resultaten zijn vermeld in tabel 7 en grafisch voorgesteld in de figuren 8 en 9.

TABEL 7

	Proef bij 19° C				Proef bij 10° C			
	Melk gewoon bewaard		11 atm. zuurstofoverdruk		Melk gewoon bewaard		10 atm. zuurstofoverdruk	
	Kiemgetal	Titer	Kiemgetal	Titer	Kiemgetal	Titer	Kiemgetal	Titer
Bij vulling	14.000	17,0	14.000	17,0	18.700	18,6	18.700	18,6
Na 1 dag	11.820.000	17,6	1.160.000	17,6	—	—	—	—
" 2 dagen	980.000.000	78,4	100.000.000	19,4	—	—	—	—
" 3 "	—	—	192.000.000	23,0	4.700.000	19,2	76.000	18,8
" 4 "	—	—	214.000.000	26,4	—	—	—	—
" 6 "	—	—	246.000.000	30,6	70.000.000	32,6	20.000	19,2
" 8 "	—	—	248.000.000	33,6	—	—	—	—
" 9 "	—	—	—	—	—	—	9.300	19,0
" 12 "	—	—	—	—	—	—	21.500	19,0
" 15 "	—	—	174.000.000	41,4	—	—	227.000	19,2
" 19 "	—	—	—	—	—	—	2.100.000	20,8
" 22 "	—	—	27.000.000	45,6	—	—	—	—
" 23 "	—	—	—	—	—	—	5.300.000	21,0
" 27 "	—	—	—	—	—	—	6.600.000	21,6
" 34 "	—	—	—	—	—	—	3.780.000	23,8

Bij 10° C is het verloop van de lijn, die het aantal bacteriën aangeeft, volkomen analoog als in de proeven bij 5° C. Het verschil is slechts, dat de groeilijn B van figuur 3 bij 10° C zoo snel stijgt, dat het proces veel sneller verloopt. Bij 19° C is dit zelfs zóó versneld, dat alleen nog maar de groeilijn B zichtbaar is. Verder blijkt, dat het „plafond” behalve door den druk (zie hoofdstuk 8) ook door de temperatuur bepaald wordt en hooger ligt naarmate de temperatuur hooger is. Na het bereiken van het plafond daalt in beide proeven het bacterieaantal. Deze daling is ook bij de in de vorige hoofdstukken besproken proeven in de derde phase waargenomen.

Doch de beschouwingen over het verschuiven van de groeilijn bij verandering van de temperatuur zijn slechts geldig als inderdaad bij hooge tem-

peratuur eenzelfde flora optreedt als bij lage temperatuur. En dit is ook werkelijk het geval. Bezien wij daartoe de proef bij 19° C nader.

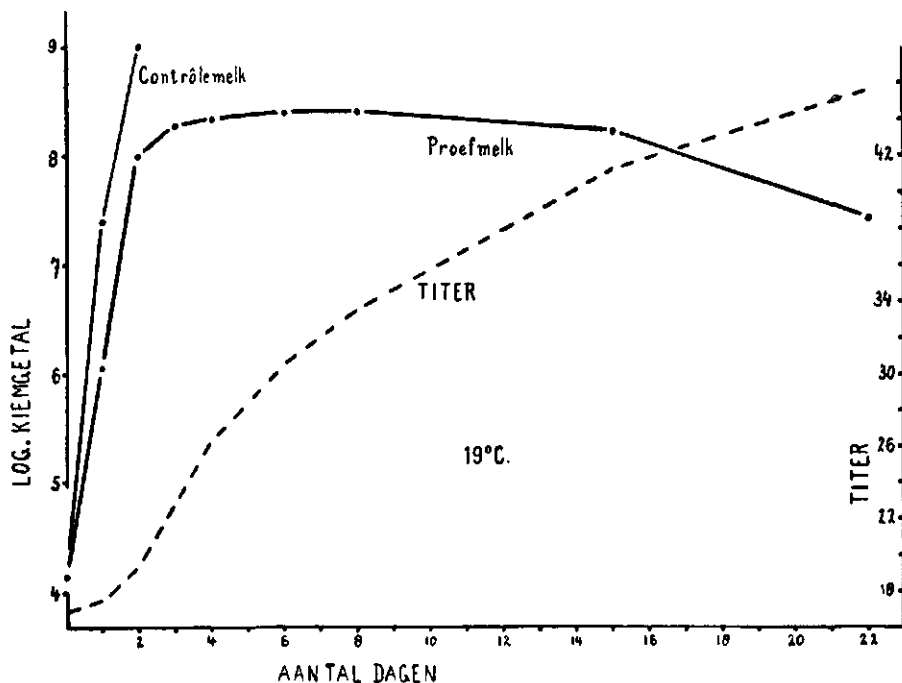


Fig. 8
Melk onder 11 atm. zuurstofoverdruk bij 19° C

Rauwe melk, welke op gewone wijze bij 19° C geplaatst wordt, bederft vrij snel (in 2 dagen), doch dit bederf vertoont niet hetzelfde karakter als dat bij 5° C. Terwijl bij 5° C de vervloeiende bacteriën het bederf veroorzaken, zijn bij het 20° C de melkzuurbacteriën van het type *Streptococcus lactis*, die de melk veranderen. Naast deze melkzuurbacteriën vindt men bovendien, vooral gedurende den eersten dag, een sterke ontwikkeling van bacteriën uit de coli-aerogenes-groep.

Dit normale bederf, waarbij dus de melk door zuurvorming in kwaliteit achteruitgaat (meestal is de melk in 2 à 3 dagen door het melkzuur gecoaguleerd), vindt men nu niet bij de proef met melk onder 11 atmosferen zuurstofoverdruk. Men ziet uit de tabel reeds hoe langzaam de zuurvorming in de zuurstofmelk voortschrijdt. Reeds na 2 dagen bestond de flora uit een rein-cultuur van een duplococcus, behoorende tot de groep der melkzuurbacteriën. Ook van deze soort is de zuurvorming weer zeer langzaam en zeer gering. Na 14 dagen kweken in gesteriliseerde melk bij 21° C onder gewone omstandig-

heden, veroorzaken zij nog geen zuurstremming. De titer van een aantal van dergelijke cultures was gemiddeld 38 ml n/10 per 100 g.

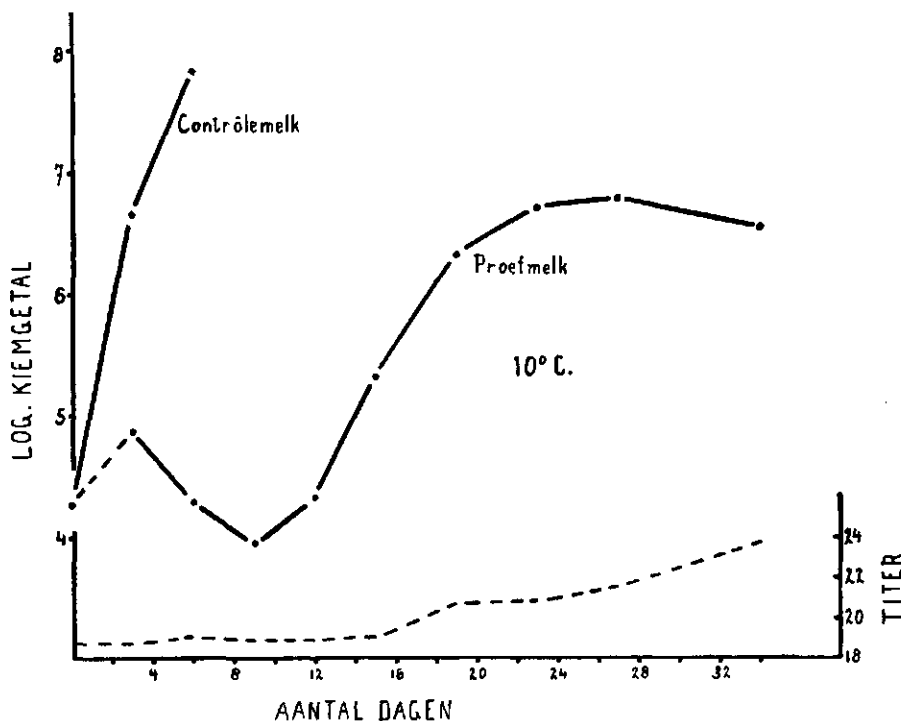


Fig. 9

Melk onder 10 atm. zuurstofoverdruk bij 10° C

Uit de contrôlemelk daarentegen, welke na 3 dagen gestremd was, werden naast colibacteriën bijna uitsluitend melkzuurbacteriën geïsoleerd, welke melk bij 21° C na 2 à 3 dagen stremden.

Evenals bij de lage temperatuur zien wij dus nu ook bij 20° hoe onder invloed van de zuurstofspanning een geheel eigen flora ontstaat, een typische „zuurstofflora”. Het was voornamelijk onmogelijk om te bepalen of de zuurstofflora bij 20° C dezelfde was als die bij 5° C. Hoewel beide florabeelden veel gelijkenis vertoonden, konden toch ook kleine verschillen waargenomen worden.

Er is geen reden om de zuurstofflora te beschouwen als eene van beschadigde of gedegenereerde melkzuurbacteriën, want na 1 jaar cultuur hadden de duplococci der zuurstofflora nog dezelfde eigenschappen. Van een beschadiging bleek ook niets bij het onderzoek van de melkzuurbacteriënflora der bij 4°—5° C bewaarde tankmelk. De melkzuurbacteriën, die tijdens de proeven geïsoleerd

werden, behoorden in groote trekken tot twee groepen. De bacteriën der eene groep stremden melk onder gewone omstandigheden bij 21° C na 6 dagen, die der andere groep na minstens 14 dagen. De melkzuurbacteriën dezer laatste groep werden alleen gevonden na het begin der tweede phase. Het zijn de bacteriën der zuurstofflora. Die der eerstgenoemde groep werden tijdens de eerste phase aangetroffen en hoewel zij dus tot de afstervende flora behooren, verandert hun zuringssnelheid tijdens dit afstervingsproces niet. Dit bewijst, dat wij hier werkelijk met twee verschillende groepen te maken hebben en dat dus de zuurstofflora niet opgevat kan worden als een degeneratieproduct van de in het begin en tijdens de eerste phase aanwezige melkzuurbacteriën, die gekarakteriseerd zijn door den stremmingsduur van 6 dagen.

Uit het voorafgaande volgt, dat de gewone snelzurende melkzuurbacteriën, die onder gewone omstandigheden bij 20° C de melk in 1—3 dagen stremmen (*Sc. lactis* en *Sc. cremoris*), zich bij 20° C onder een zuurstofdruk van 10 atmosferen niet kunnen ontwikkelen. De zuurstofdruk alleen is dus reeds voldoende om den groei der gewone melkzuurbacteriën tegen te gaan. Bij de lage temperatuur van 5° C zullen ze zich bovendien om een tweede reden niet kunnen vermeerderen, n.l. wegens de lage temperatuur zelf. Bij 5° ontwikkelen zich de gewone melkzuurbacteriën nauwelijks.

Een twaalfstal stammen van gewone melkzuurbacteriën (*Sc. lactis* en *Sc. cremoris*) werden in een hoeveelheid van 1 % melkcultuur geënt in gesteriliseerde centrifugemelk en bij 5° C geplaatst op 9 April 1937. Na 55 dagen bedroegen de titercijfers in ml n/10 per 100 g resp. 20, 20, 21, 22, 24, 27, 31, 33, 34, 36, 45 en 71.

Slechts één had dus duidelijke zuurvorming. De andere hadden geen of zeer weinig werking uitgeoefend, doch waren bij de lage temperatuur niet gestorven, want toen de cultures na 55 dagen bij 21° C geplaatst werden, waren alle na 1 à 2 dagen gestremd.

Als we de resultaten der proeven, uitgevoerd bij verschillende zuurstofspanningen en verschillende temperaturen, combineeren, dan volgt daaruit, dat de groei der 2de phase later komt naarmate de druk hooger en de temperatuur lager is en dat het bereikte „plafond” lager ligt bij hooger en lagere temperatuur. Hieruit zou af te leiden zijn, dat er bij iedere temperatuur een critische zuurstofdruk zou moeten bestaan, waarboven binnen 2 maanden geen groei der 2de phase optreedt. Deze critische zuurstofdruk zal lager liggen naarmate de bewaartemperatuur lager is. Het schijnt, dat bij 4° C deze critische druk bij 11 à 12 atmosferen overdruk ligt. Nauwkeurig is dit moeilijk te bepalen, daar de voor dergelijke proeven noodige, zeer constante temperatuur moeilijk te verwezenlijken is.

12. Het veranderen van zuurstofdruk en temperatuur tijdens het bewaren

In de hoofdstukken 8 en 11 hebben wij gezien hoe het „plafond”, bereikt na de groeiperiode der „zuurstofflora”, afhankelijk is van druk en temperatuur. Het maximum aantal bacteriën is n.l. hoger bij lagere zuurstofdruk en hogere temperatuur.

Dit verschijnsel zal doen verwachten, dat het aantal bacteriën zal stijgen indien tijdens het bewaren de druk in de tanks daalt, iets wat in de praktijk ongetwijfeld zal voorkomen, hetzij als gevolg van gaslekken, hetzij als gevolg van herhaald aftappen van kleine hoeveelheden melk zonder overeenkomstige bijvulling van zuurstof.

De proef, welke wij hierover namen, heeft dit bevestigd. Nadat de tank van tabel 1 69 dagen onder een zuurstofoverdruk van 9 à 9½ atmosferen bij 4°—5° C gestaan had, werd de druk verlaagd tot 7½ atmosfeer. Dadelijk volgde een sterke groei der zuurstofflora, zich bovendien uitende door een toename van den zuurgraad.

Na 28 dagen bij 7½ atmosfeer werd de overdruk wederom verhoogd tot 11 atmosferen en aangezien dus toen het evenwicht tusschen „plafond” en zuurstofdruk verbroken was, trad een daling op, die wij nog 48 dagen vervolgd hebben. In deze periode steeg de titer door de aanwezigheid van zoo vele bacteriën nog iets, doch slechts weinig. Nadere gegevens vindt men in tabel 8, welke dus op tabel 1 aansluit, terwijl figuur 10 de grafische voorstelling geeft.

TABEL 8

Invloed van drukverandering tijdens bewaren bij 4°—5° C

Zuurstof- overdruk	Aantal dagen		Kiemgetal	Titer
	sedert begin der proef	sedert druk- verandering		
9—9½	48	—	355.000	18,2
	55	—	220.000	18,6
	69	—	172.000	18,4
7½	79	10	581.000	18,2
	94	25	26.000.000	21,6
11	112	15	38.200.000	26,2
	124	27	16.000.000	26,6
	139	42	2.110.000	—
	145	48	1.350.000	27,0

Door de drukverlaging is de conserveering dus ernstig in gevaar gebracht. De flora veranderde evenwel slechts weinig. Naast de na 69 dagen

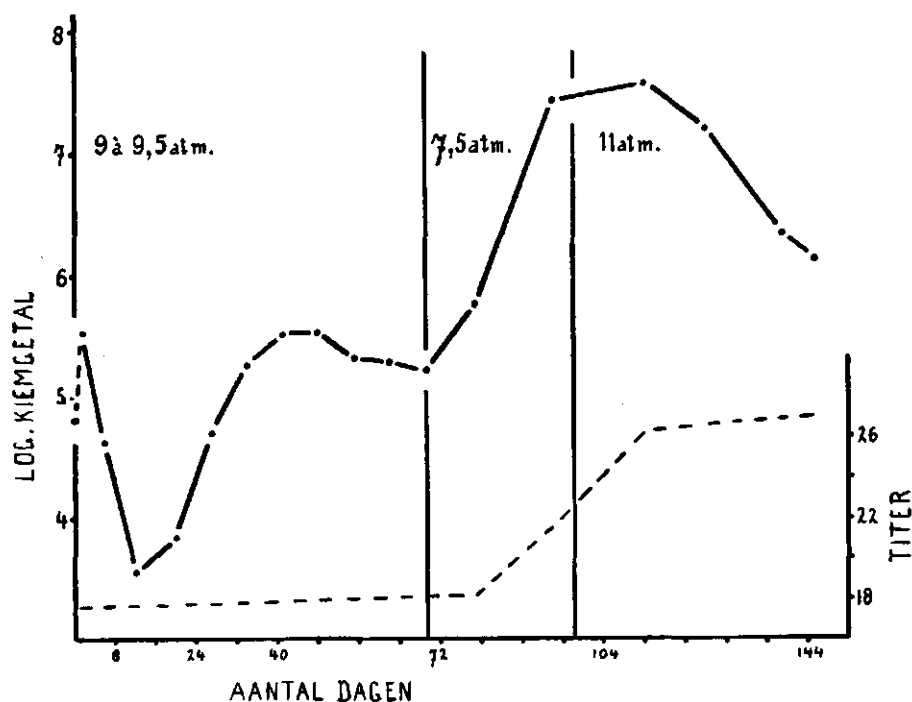


Fig. 10

Melk bij 4°—5° C onder verschillende zuurstofspanningen

aanwezige flora, welke geheel op een reincultuur geleek, kwamen nu ook andere bacteriën tot ontwikkeling, doch ook deze waren melkzuurbacteriën met een uiterst gering zuringsvermogen. Zij onderscheidden zich slechts door een ander kolonietype op gelatine en vertoonden veel overeenkomst met die, welke ook in de tanks met 5 en 8 atmosferen zuurstofoverdruk gevonden werden (zie hoofdstuk 8). Hieruit blijkt wel hoe dus niet bij iederen zuurstofdruk hetzelfde type van melkzuurbacterie mogelijkheid tot ontwikkeling heeft, hetgeen wij ook reeds bij de lage overdrukken van 1; 2 en 3½ atmosfeer concludeerden (hoofdstuk 9).

De sterke bacteriegroei heeft op de kwaliteit der melk grooten invloed gehad. Op den 112den dag was de geur zuur en de smaak zuur en bitter. Bij koken schiftte de melk. Zij was dus niet meer bruikbaar.

Bij de proef, vermeld in tabel 3, werd de invloed van een temperatuurverhooging bepaald. Nadat de tank met $10\frac{1}{2}$ atmosfeer zuurstofoverdruk 69 dagen bij 4° — 5° C gestaan had, werd zij bij 19° C geplaatst, waarbij de druk door afblazen op $10\frac{1}{2}$ atm. gehouden werd. Na een verblijf van 32 dagen bij 19° werd de tank weer bij 4° — 5° C geplaatst en ook thans de druk weer op $10\frac{1}{2}$ atm. gebracht. Resultaten vermeldt tabel 9 en figuur 11.

TABEL 9

Invloed van temperatuurverandering bij bewaren onder $10\frac{1}{2}$ atm. zuurstofoverdruk

Temperatuur	Aantal dagen		Kiemgetal	Titer
	sedert begin der proef	sedert temperatuurverandering		
4° — 5° C.	55	—	450.000	—
	62	—	256.000	18,0
	69	—	172.000	18,4
19° C.	89	20	5.000.000	20,4
	97	28	22.000.000	25,6
4° — 5° C.	117	16	13.600.000	28,0
	133	32	9.900.000	28,8

Op den 97en dag was ook deze melk zurig van smaak; de geur was eenigszins op diacetyl gelijkend. In de flora was geen principieele verandering gekomen. Alleen waren, behalve de op den 69en dag aanwezige bacteriën, nog melkzuur bacteriën van een andere soort gegroeid, veel gelijkend op die, welke in de tanks met 5 en 8 atm. zuurstofoverdruk (zie hoofdstuk 8) werden gevonden naast de gewone melkzuurbacteriën der zuurstofflora. De toegepaste veranderingen in druk en temperatuur hebben dus tot eenzelfde resultaat geleid.

13. De schijnbare toename van het aantal bacterien in de eerste dagen

Bij alle proeven, welke met rauwe melk genomen werden, vonden wij een zeer sterke toename van het aantal bacteriën als na een verblijf van 1 of 2 dagen het eerste monster uit de tank werd afgetapt (zie b.v. tabellen 1, 3, 5 en 6).

Dit verschijnsel zou mogelijk verklaard kunnen worden door een besmetting van de aftapinrichting, welke n.l. door verpakking met stoffen, die hitte

niet verdragen kunnen, bezwaarlijk volkomen bacterievrij gemaakt kon worden.

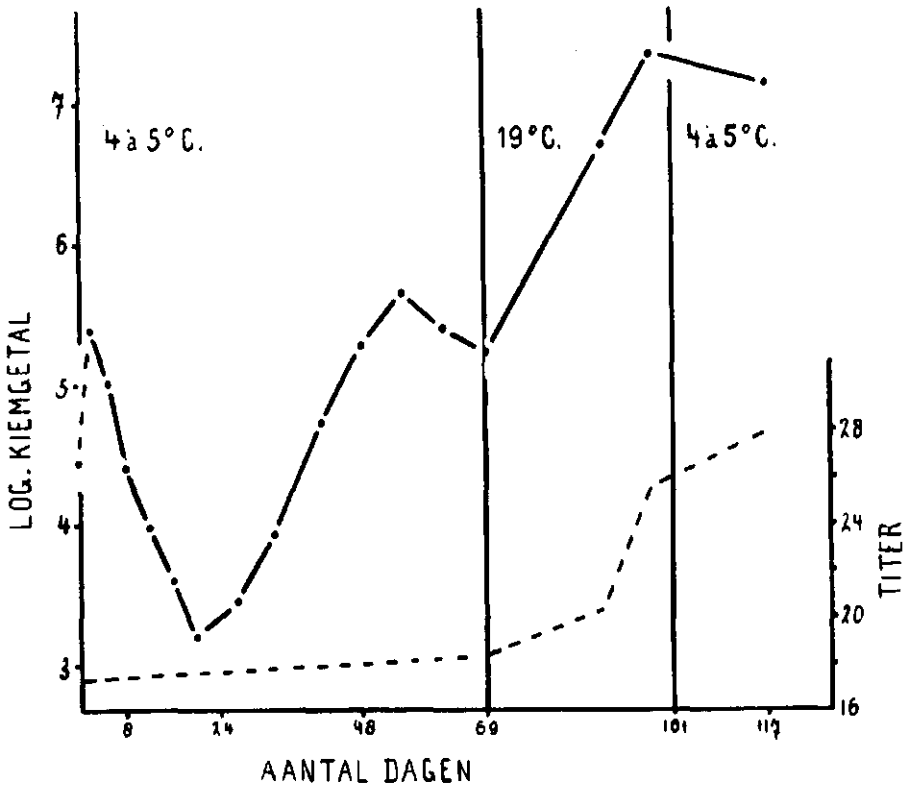


Fig. 11

Melk onder $10\frac{1}{2}$ atm. zuurstofoverdruk bij verschillende temperaturen

Een infectie door de ingeblazen zuurstof zou ook mogelijk zijn, indien zich bijv. in de zuurstofslang vuilhaarden bevinden. Om de rubber zuurstofslang te sparen, werd deze nl. nooit gesteriliseerd.

Ten slotte bestond de mogelijkheid van een sterken groei van bacteriën in den begintijd, als de zuurstof nog niet tot de bij den druk behoorende evenwichtsconcentratie was opgelost, eventueel bevorderd door een prikkelenden invloed van de zuurstof of een vernietiging van bactericide stoffen door de zuurstof.

Bij het onderzoek van de aanwezige bacteriesoorten bleek, dat in deze groote bacterietoename voornamelijk melkzuurbacteriën betrokken waren. Het aantal andere bacteriën bleef ongeveer constant. Pas na ongeveer een week was het aantal dezer „bijgekomen” melkzuurbacteriën weer zoover

gedaald, dat de uit de tanks getapte melk ongeveer dezelfde flora had als in de tank gebrachte verse melk.

Bij het nader bestudeeren van deze kwestie bleek, dat geen der bovengenoemde veronderstellingen juist was, maar dat het verschijnsel een geheel andere oorzaak had.

Eerst werd een proef gedaan, waarbij na nog korter tijden na de vulling van de tank monsters genomen werden ter bepaling van het kiemgetal. De gebruikte zuurstofoverdruk was 10 atmosferen, de temperatuur 4° — 5° C.

Bij deze proef was het aantal bacteriën van

de verse melk	23.500,
het monster na 4 uur	333.000,
het monster na 9 uur	229.000 en
het monster na 15 uur	167.000.

Deze proef sluit de mogelijkheid van bacteriegroei wel geheel uit. Er is juist blijkbaar een dadelijk intredende bacteriedooding.

Bij de tweede proef werd nagegaan of de tank zelf, welke als gewoonlijk met door stoom verhit water gereinigd werd, nog infectie gaf.

Het aantal bacteriën was

in de verse melk in de melkbus	15.700,
in de verse melk, in de tank gegoten,	16.100,
direct na de 1e vulling met zuurstof	211.000,
direct na de 2e vulling met zuurstof	205.000 en
na 4 uur verblijf in de tank	118.000.

Hieruit volgt, dat de tank inderdaad goed gesteriliseerd was. Het verschijnsel der bacterietoename is direct aanwezig na het toepassen van den zuurstofdruk, doch bij deze proef kon dit niet aan een onvolkomen sterilisering van de aftapinrichting geweten worden, daar de aftapinrichting in een autoclaaf gesteriliseerd was, hetgeen door het gebruik van loodpakking thans mogelijk was.

De derde proef werd genomen om te onderzoeken of een infectie door de zuurstofslang werd veroorzaakt. Uit de tweede proef kunnen wij echter reeds afleiden, dat een dergelijke infectie niet waarschijnlijk is, omdat de toename van het bacterieaantal na de vulling met zuurstof zoo buitengewoon groot is en het aantal bacteriën na een tweede vulling met zuurstof niet meer toenomen is.

Bij de uitvoering der derde proef werd de zuurstofslang gesteriliseerd door langdurig doorblazen met stoom van 100° C. Het aantal bacteriën per ml. was:	
in de verse melk in de tank	12.400,
direct na de 1e vulling met zuurstof in een monster, afgetapt uit de kraan,	135.200,
na afblazen van de zuurstof in een monster, met een pipet uit de tank genomen,	18.400,
direct na de 2e vulling met zuurstof in een monster, afgetapt uit de kraan,	128.800,
na wederom afblazen van de zuurstof in een monster, met een pipet uit de tank genomen,	8.800,
na 2 dagen verblijf in de tank onder 10 atm. zuurstofoverdruk, in een monster, afgetapt uit de kraan,	18.000,
na 2 dagen verblijf in de tank onder 10 atm. zuurstofoverdruk in een monster, met een pipet uit de tank genomen na afblazen van de zuurstof,	9.800.

Uit deze proef volgt duidelijk, dat alleen de melk uit de aftapkraan de groote bacterietoename vertoont, doch de melk in de tank niet. Er worden dus geen bacteriën uit de zuurstofslang in de melk geblazen. De toename wordt blijkbaar alleen veroorzaakt door de mechanische bewerking van het aftappen der melk onder 10 atmosfeer overdruk. Dit beteekent dus, dat bij het persen van de melk door de nauwe aftapopening bij dezen hoogen druk de bacterieklompjes, die in de melk voorkomen, stukgeslagen worden. In de verse melk en in de melk in de tank wordt ieder bacterieklompje als één bacterie geteld; in de afgetapte melk geeft zoo'n klompje zooveel bacteriën als het aantal kleinere klompjes of losliggende bacteriën, waarin het uit elkaar geslagen is. Deze bacterieklompjes bestaan blijkbaar voornamelijk uit melk-zuurbacteriënachtige bacteriën en daar deze bacteriën sneller dan de andere afsterven (na 1 week vertoonde de melk immers weder dezelfde flora als de verse melk), zal het verschil in bacteriegetal tusschen de onder druk afgetapte melk en de na aflaten van den zuurstofdruk met een pipet uit de tank genomen melk in de volgende dagen steeds kleiner moeten worden, hetgeen ook inderdaad blijkens de opgegeven getallen het geval is.

Is deze opvatting van het desintegreeren der bacterieklompjes bij het aftappen juist, dan zullen we moeten verwachten, dat de toename van het bacteriecijfer, door het aftappen veroorzaakt, sterker is naarmate de druk, waaronder de melk staat, hooger is. Dit werd bevestigd met een hiervoor speciaal ingerichte proef, waarbij de melk wederom in een met heet water

en stoom gesteriliseerde tank gegoten werd, waarvan ook de aftapinrichting volkomen gesteriliseerd werd.

We vonden nu de volgende cijfers voor het aantal bacteriën per ml.	
Versche melk na uitgieten in de tank	32.300.
De melk werd nu onder $\frac{1}{2}$ atmosfeer overdruk gebracht. Het direct hierna door de kraan afgetapte monster bevatte.	40.800.
De overdruk in de tank werd verhoogd tot 4 atmosferen en vervolgens werd een monster uit de kraan afgetapt. Het bevatte	249.600.
De overdruk werd gebracht op 10 atmosferen. Het hierna op dezelfde wijze afgetapte monster bevatte	490.000.
Nu werd de tank bijna geheel door de aftapinrichting geleidigd om deze zoo goed mogelijk door te spoelen en de zuurstof geheel afgeblazen. Na het aanbrengen van wederom $\frac{1}{2}$ atm. overdruk werd in het kraanmonster gevonden.	29.700.
Na drukverhooging tot 10 atm. overdruk was het kiemgetal van het monster uit de kraan weer	455.000.

Hiermede is het feit van het breken der bacterieklompjes in kleinere bestanddeelen bewezen. Hoe hoger de druk is, des te krachtiger is de desintegreerende werking. Dit verschijnsel ziet men ook terug in de tabellen 3, 5 en 6, waar het aantal bacteriën

bij 1	atmosfeer tot	225 %,
bij 2	atmosfeer tot	330 %,
bij $3\frac{1}{2}$	atmosfeer tot	420 %,
bij 5	atmosfeer tot	1200 %,
bij 8	atmosfeer tot	1200 %,
bij $10\frac{1}{2}$	atmosfeer tot	900 % en
bij 11	atmosfeer tot	3700 %.

van het oorspronkelijk aantal stijgt.

Deze reeks is niet geheel regelmatig. Dit kan aan verschillende oorzaken te wijten zijn, bijv. het varieerende aantal klompjes in de uitgangsmelk van verschillende data, het verschil in tijdsduur tusschen de vulling der tanks en het tijdstip der eerste monsterneming, hetwelk in deze reeks 1 of 2 dagen was en het verschil in uitstroomingssnelheid bij de monsterneming.

Bij $10\frac{1}{2}$ atm. overdruk werd een geringere procentische toename gevonden dan bij 8 atm., hoewel bij beide drukken dezelfde melk gebruikt was. Dit moge verklaard worden uit de omstandigheid, dat de melk, waarmede de tank van $10\frac{1}{2}$ atm. gevuld werd, later tot 4° C afgekoeld werd dan de andere melk

en aangezien het kiemgetal in dezen tijd gestegen was, zal daardoor het aantal bacterieklompjes verhoudingsgewijze geringer geworden zijn.

Bij den groei der 2de phase ontstaat een flora van duplococceen. Daar duplococceen veelal voorkomen in den vorm van streptococceen, waarin de duplococceen losjes aan elkaar verbonden zijn, mogen we verwachten, dat het verschijnsel der desintegratie bij het aftappen onder druk ook hier bemerkbaar zal zijn. Inderdaad is dit het geval. We konden dit constateeren bij het openen van de tanks bij het beëindigen van een proef. Er werd dan eerst een monster genomen door aftappen onder den bestaanden druk en later, na het afblazen van de zuurstof, met een pipet uit de tank. Tabel 10 geeft hiervan enkele cijfers.

TABEL 10

	Kiemgetal	
	Kraan- monster	Pipet- monster
Proef van tabel 8.	1.350.000	1.040.000
Proef van tabel 2.	447.000	125.000
Proef van tabel 3, 5 atm.	6.800.000	4.550.000
Proef van tabel 3, 8 atm.	229.000	128.000

Het hier beschreven verschijnsel van het in kleinere deelen uiteenvallen der bacterieklompjes werd ook door anderen waargenomen bij het homogeniseeren, waarbij de melk een soortgelijke bewerking ondergaat, zij het onder veel hooger en druk.

14. De duurzaamheid van uit de tanks getapte melk

Bij het tot nu toe besprokene is de samenstelling der flora in de zuurstofmelk bepaald door van de afgetapte melk koloniëncultures op gelatine aan te leggen. Deze methode is echter niet nauwkeurig als men een flora bestudeert, welke zeer veel bacteriën van één soort en slechts weinig van andere soorten bevat, daar de verdunningen voor het maken van gelatinecultures zóó gekozen worden, dat op gelatine-oppervlakken van 12 cm diameter 100 à 1.000 koloniën ontstaan. Bij een verhouding 100 : 1 zal men dus de aanwezigheid van andere bacteriën te midden der hoofdflora al niet meer kunnen aantoonen. Hiervoor zijn dan ophoopingproeven noodig.

Wat de colibacteriën betreft, hierover wordt in een volgend hoofdstuk bericht.

De eventuele aanwezigheid van vervloeiende bacteriën en melkzuurbacteriën konden wij combineeren met de duurzaamheidsproeven. Bij deze proeven werd de melk uit de tank afgetapt in een gesteriliseerde kolf en bij 21° C geplaatst tot zichtbare verandering was opgetreden. Deze eenvoudige proef gaf 2 resultaten, n.l. een inzicht in de duurzaamheid van de afgetapte melk en de mogelijkheid om andere bacteriën aan te toonen. De hoofdflora van de „zuurstofduplococcen” toch veranderde zoo weinig aan de melk, dat zij als voedingsbodem voor andere bacteriën geschikt bleef.

Bij alle proeven, bij hooger en druk genomen, werd steeds hetzelfde resultaat verkregen, zoodat wij kunnen volstaan met een tabellarisch overzicht (tabel 11) van de gegevens, verkregen met de melk onder 10½ atmosfeer zuurstofoverdruk van tabel 3. In het bijzonder is gelet op den tijd, welke verliep tusschen aftappen en stremming, omdat de stremming in bijna alle gevallen de eenig zichtbare verandering was.

TABEL 11

Bewaartijd in dagen	Stremming bij 21° in dagen	Geur der gestremde melk	Bacteriën in de gestremde melk
0	2	zuur	melkzuurbacteriën, coli
2	3	„	
8	3	„	melkzuurbact., coli, vervloeiende
16	3	„	melkzuurbact., vervloeiende
20	4	„	melkzuurbact., coli, vervloeiende
27	5	„	melkzuurbact., coli, vervloeiende
41	6	„	melkzuurbact., vervloeiende
55	8	„	melkzuurbact., coli
62	9	„	

In de gestremde melk waren de melkzuurbacteriën altijd in zeer groote aantallen aanwezig; de andere in de tabel genoemde soorten kwamen er in gering aantal in voor. Ook deze proef leert, dat tijdens het bewaren de snelzurende melkzuurbacteriën langzamerhand vernietigd worden. Aan het einde van den bewaartijd bevinden zich in de tankmelk nog slechts de langzaam zurende melkzuurbacteriën.

Niet altijd ging de stremtijdverlenging tot 8 à 9 dagen. In andere gevallen was de stremtijd aan het einde van de proeven 5 of 6 dagen.

Er blijkt uit deze proeven, dat coliachtige en vervloeiende bacteriën toch pas na zeer langen tijd geheel en al verdwenen zijn, zooals men ook al kan vermoeden uit het verloop van de afstervingslijn van figuur 7.

Nog op andere wijze is bestudeerd hoe de uit de tank getapte melk zich hield. Uit de tank van de proef van tabel 1 werd op 18 Mei, d.i. dus toen de melk 69 dagen onder den zuurstofdruk bewaard was bij 4°—5° C, een monster melk afgetapt en hiervan verschillende hoeveelheden (0,000.01 tot 10 ml) geënt in gesteriliseerde centrifugemelk. Een serie werd bewaard bij 4°—5° C en een andere bij 21° C.

In de serie bij 21° C werd de bacterienontwikkeling vervolgd door uitzaaiing op gelatine om de 2 dagen. Steeds werden alleen maar de zeer zwak zurende melkzuurbacteriën gevonden. In de kolfjes, geënt met 0,000.01 en 0,000.1 ml, werd een reincultuur van dergelijke bacteriën aangetroffen, bij de zwaardere entingen was er een gemengde flora van verschillende soorten van deze bacteriën.

De afgetapte melk en de melk, geënt met 10; 1; 0,1 en 0,01 ml, waren na 9 dagen gestremd, de zwakker geënte pas na 22 dagen. Bij overentingen bleef deze flora en de stremtijd van 8 à 9 dagen behouden.

Ook in de serie bij 4°—5° C werd geen andere bacteriënontwikkeling waargenomen dan van de zwak zurende coccen en wel een zeer langzame. Na 1 maand was b.v. de titer der afgetapte melk zelf 55 ml n/10 per 100 g, die van de melk, geënt met 0,001 ml 28,2, terwijl de nog zwakker geënte melk zelfs niet bij koken stremde. De afgetapte melk was in dien tijd zuur van geur en smaak geworden en bevatte per ml 254.000.000 bacteriën. Deze melk is dus in de maand van bewaren wel bedorven, zooals ook niet anders verwacht kan worden, doch ook dit bederf is van milden aard en totaal afwijkend van het gewone melkbederf.

15. De doodende invloed op colibacteriën

Bij vele proeven werd het verloop van het aantal colibacteriën vervolgd. Wij gebruikten daarvoor de Mc. CONKEY vloeistof (water, pepton, glucose, Na-taurocholaat, neutraalrood, pH 7) in buizen met omgekeerde kleine buisjes (Durhambuizen). Hierin werden in drievoud verdunningen van de melk geënt en als positief werden in rekening gebracht de buizen, waarin gas- en zuurvorming was opgetreden bij 38° C. De opgegeven cijfers zijn berekend met behulp van de tabellen van Mc. CRADY.

Uit tabel 12 ziet men hoe de colibacteriën langzaam in de proefmelk vernietigd worden. Na 20 dagen zijn zij in 1 ml niet meer aantoonbaar. Steekproeven na dien tijd met 10 ml melk verliepen eveneens negatief.

TABEL 12

Aantal colibacteriën per ml bij verschillende proeven bij 4°—5° C

Aantal dagen	Proef van tabel 1		Proef van tabel 3				Proef van tabel 6	
	contrôle	9 atm.	contrôle	5 atm.	8 atm.	10,5 atm.	contrôle	11 atm.
0	4,5	4,5	0,7	0,7	0,7	9,5	2,5	2,5
2	9,5	9,5	0,9	0,9	4	4,5	2,5	20
4	—	—	—	—	—	—	13,0	6
5	—	—	160	0,3	0,2	0	—	—
6	4,0	2,5	—	—	—	—	25.000	2,5
8	—	—	95.000	0,7	0	0,45	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	0,9
12	95.000	0	200.000	0	0	0	—	—
16	—	—	—	0,09	0	0,04	—	0,4
20	—	—	—	0	0	0	—	0
27	—	0	—	—	—	—	—	—
34	—	0	—	0	0	0	—	0

Deze vernietiging vindt ook plaats in op hooger temperatuur bewaarde melk, zooals men ziet uit tabel 13, al is er dan bij 19° eerst een toename.

TABEL 13

Aantal colibacteriën per ml bij de proeven van tabel 7

Aantal dagen	Proef bij 19°		Proef bij 10°	
	contrôle	11 atm.	contrôle	10 atm.
0	2,5	2,5	2,5	2,5
1	600.000	25	—	—
2	2.500.000	25	—	—
3	—	6.000	25.000	—
4	—	60	—	—
6	—	45	25.000.000	4,5
8	—	45	—	—
9	—	—	—	4,5
12	—	—	—	0
15	—	0	—	0
22	—	0	—	0

Bij het onderzoek over den invloed van den zuurstofdruk op colibacteriën werd onze aandacht getrokken door het feit, dat in verscheidene der gistings-buizen een zuurvorming optrad, niet vergezeld van een gasontwikkeling. Uit alle buizen met positieve colireactie (gas + zuur) werd een afstrieking gemaakt op gelatine ter bevestiging, dat inderdaad coli aanwezig was. Dit

werd ook gedaan met de buizen, waarin alleen zuurvorming geconstateerd was. Bij vele ervan werden alleen melkzuurbacteriën gevonden, omdat de selectiviteit van de Mc CONKEY-proef niet zóó groot is, dat bij zware enting met melkzuurbacteriën deze niet tot geringe ontwikkeling kunnen komen. Doch een aantal dezer buizen bevatte ook coliachtige bacteriën. En juist deze bacteriën zijn veel minder gevoelig voor de nadeelige invloeden van zuurstofdruk en lage temperatuur dan de gewone, typische colibacteriën.

Worden ook deze bacteriën in rekening gebracht, dan wordt het aantal colibacteriën, zooals dit in tabel 12 opgegeven is, anders en wel zooals men in tabel 14 vindt.

TABEL 14

Aantal typische en atypische colibacteriën per ml bij verschillende zuurstofdruk in proeven, uitgevoerd bij 4°—5° C

Aantal dagen	Zuurstofoverdruk van		
	5 atm.	8 atm.	10,5 atm.
0	2	2	9,5
2	3	4	4,5
5	1,5	3	0,45
8	1,5	—	0,45
12	0,3	2	—
16	0,35	—	0,75
20	0,9	9,5	0,3
33	0,09	9,5	0,04
48	0	4,5	0,04
70	0	0,9	0

Deze minder gevoelige coliachtige bacteriën hebben wij niet bij alle proeven aangetroffen. Zijn ze evenwel aanwezig, dan moet men er dus rekening mede houden, dat zij slechts langzaam vernietigd worden.

Over deze atypische colibacteriën hebben wij nog enkele proeven genomen. Reincultures van verschillende stammen werden verkregen uit gewone bij 4° C bewaarde melk, uit de Mc CONKEY-proef bij onder zuurstofdruk bewaarde melk en uit melk, welke na het aftappen uit de tanks, eenigen tijd bij 21° C bewaard was.

Deze reincultures vertoonden een goeden groei bij de lage temperatuur van 4° C, terwijl gewone typische colibacteriën op gelatine bij 4° C geen spoor van groei vertoonden. Hoewel deze laatste dus niet tot ontwikkeling kwamen, stierven zij door de inwerking der lage temperatuur niet, want toen zij na 3 weken verblijf bij 4° C bij 21° C geplaatst werden, trad duidelijke en snelle groei op.

De atypische colibacteriën, waarvan wij dus moeten aannemen dat zij speciaal op lage temperaturen ingesteld zijn, zijn voor een deel geïsoleerd uit negatieve gistingssproeven. Toch missen zij niet geheel en al het vermogen tot gasvorming. In een proefreeks, uitgevoerd bij 21°, 28° en 38° C, vormden zij bij 21° C een weinig gas na 2 dagen. Bij 28° was het gistingresultaat hetzelfde, doch bij 38° vertoonde slechts de helft een geringe gasvorming. Door toevoeging van Na-formiaat kon geen sterkere gasvorming worden verkregen. In hun andere eigenschappen wijken deze bacteriën ook van de gewone *Bact. coli* en *Bact. lactis aerogenes* af. In de indol-, methylood-, Voges Proskauer- en citraatproeven vertoonden zij n.l. het — + — + type.

Ook uit de hierboven beschreven bij verschillende temperaturen uitgevoerde gistingssproeven blijkt de voorkeur van deze atypische colibacteriën voor lagere temperaturen. Deze is dan ook waarschijnlijk de reden, dat deze bacteriën in de tanks niet zoo snel afsterven.

Om hierin een nader inzicht te krijgen, werd met *coli* geënte, gesteriliseerde melk in een tank onder 10 atmosfeer zuurstofoverdruk gebracht en bewaard bij 4°—5° C. Voor deze proef werd zoowel een atypische kryophile coliachtige als een typische gewone stam, behoorende tot de *coli-aerogenes*-groep gebruikt. Van beide werd een controlemonster bij dezelfde temperatuur bewaard, doch niet onder zuurstofdruk.

Daar de atypische coliachtige in de Mc CONKEY- vloeistof geen gas vormt, werd het aantal van deze bacteriën bepaald met de plaatmethode. Voor de andere werd het kiemgetal met de verdunningsmethode door de gistingssproef bepaald.

TABEL 15

Proef met in steriele melk geënte colibacteriën bij 4°—5° C

Aantal dagen	Atypische		Typische	
	contrôle	zuurstofdruk	contrôle	zuurstofdruk
0	1.970.000	1.970.000	4.500.000	4.500.000
3	48.700.000	3.420.000	950.000	750.000
6	383.000.000	4.770.000	450.000	9.500
10	—	—	150.000	25
13	—	7.000.000	—	—
20	—	8.000.000	110.000	0,6
37	—	8.000.000	—	—
58	—	290.000	—	—

Deze proef bevestigt volkomen de vorige, met gewone rauwe melk genomen proeven. De typische *coli-aerogenes* wordt door de lage temperatuur alleen

reeds sterk geschaad en de zuurstof versnelt het doodingsproces in merkbare mate. De atypische coliachtige heeft het vermogen om bij lage temperatuur snel te groeien. Ook deze wordt door zuurstof ernstig geschaad, doch deze twee invloeden houden elkaar in de eerste weken ongeveer in evenwicht. Pas later begint de doodende werking der zuurstof merkbaar te worden.

16. Enkele eigenaardigheden bij de bepaling van het kiemgetal

In het algemeen was er bij de bepaling van het aantal bacteriën door middel van de plaatmethode een goede overeenstemming tusschen de tellingen der drietallen platen. Om hiervan eenig inzicht te geven verwijzen wij naar tabel 16, waar een reeks tellingen van de proef van tabel 3 met de melk onder $10\frac{1}{2}$ atm. zuurstofoverdruk wordt vermeld.

TABEL 16

Tellingen van koloniewaantallen in agarplaten

Aantal dagen	Aantal koloniën op 3 platen			Hoeveelheid melk	Kiemgetal	Grootste afwijking van gemiddelde
Bij vulling	267	285	311	0,01 ml	28.800	7,9 %
Na 2 dagen	237	262	266	0,001	255.000	7,1
" 5 "	98	107	112	0,001	106.000	7,5
" 8 "	227	253	280	0,01	25.300	10,7
" 12 "	95	97	—	0,01	9.600	1,0
" 16 "	395	404	420	0,1	4.060	3,4
" 20 "	154	168	170	0,1	1.640	6,1
" 27 "	263	279	294	0,1	2.790	5,7
" 33 "	827	874	889	0,1	8.630	4,2
" 41 "	523	529	529	0,01	52.700	0,8
" 48 "	181	199	226	0,001	202.000	11,9
" 55 "	436	464	—	0,001	450.000	3,1
" 62 "	193	286	288	0,001	256.000	24,6
" 69 "	136	183	198	0,001	172.000	20,9

In de laatste kolom is aangegeven hoeveel de telling, welke het sterkste van het gemiddelde der 3 tellingen verschilde, van dit gemiddelde afweek, uitgedrukt in procenten van het gemiddelde. Daaruit zien wij, dat de bacterietellingen het nauwkeurigst zijn in de periode van groei en het minst nauwkeurig in de fasen, waarin een dooding van bacteriën optreedt en dit vooral in de laatste fase, als het „plafond” eenmaal bereikt is. Dit verschijnsel werd in alle proeven waargenomen.

Verder willen wij er nog op wijzen, dat de telresultaten dikwijls ongunstig beïnvloed werden door de aanwezigheid van aerobe sporevormende bacteriën,

die in zeer groote koloniën de agarplaten overwoekerden (z.g. spreiders). Daar deze bacteriën in de melk nooit in groote aantallen voorkwamen, waren zij meestal alleen maar hinderlijk bij die tellingen, waarbij door een gering bacteriegehalte grootere hoeveelheden (0,1 of 0,01 ml) melk voor de bepaling van het kiemgetal gebruikt werden.

17. Geur en smaak der zuurstofmelk

Naar ons medegedeeld werd, zou bij het afblazen van de zuurstof na de eerste vulling van de tanks met zuurstof (welk afblazen noodig is om de stikstof der lucht te verwijderen) de afgeblazen zuurstof zooveel onaangename melkgeuren meedragen, dat men dit aan deze afgeblazen zuurstof ruiken kan. Dit is door ons echter niet waargenomen, doch mogelijk houdt dit verband met de goede kwaliteit der door ons gebezigde melk. Bij enkele proeven met gepasteuriseerde melk althans konden wij constateeren, dat de afgeblazen zuurstof in sterke mate den typischen „kookgeur” van gepasteuriseerde melk had.

Bij het beoordeelen van uit de tanks afgetapte zuurstofmelk moet men de keuring op geur en smaak niet verrichten bij de lage bewaar temperatuur, omdat kleine afwijkingen dan niet geconstateerd kunnen worden. Ook bij kamertemperatuur is de geurbeoordeeling niet voldoende scherp. Wij hebben daarom steeds den geur bepaald tijdens het verwarmen van de melk over een traject van 15° C tot kooktemperatuur. De smaak werd in hetzelfde monster bepaald na afkoelen tot kamertemperatuur. Daardoor werd ook geen hinder ondervonden van de prikkelende werking der zuurstofbelletjes op de mond-slijmvliezen.

Bij alle proeven met melk werden bij de beoordeeling der afgetapte monsters dezelfde resultaten verkregen. In de eerste dagen zijn geur en smaak vrijwel geheel normaal. Na een aantal dagen begint een flauwe smaak op te treden, die meestal erger wordt en dan op „zoet” begint te gelijken. In de latere periode wordt bovendien dikwijls een zeer geringe bittere smaak geproefd en is de melk soms iets wrang of adstringeerd. De geur is meestal zeer weinig afwijkend, eenigszins flauw en bij lang bewaren iets zurig.

Ter illustratie geven wij in tabel 17 een overzicht van enkele proeven.

De afwijkingen in geur en smaak zijn dus wel gering, zóó dat men slechts van „iets afwijkend” kan spreken en zeker niet van een gebrek. De geconstateerde geringe afwijkingen schijnen onafhankelijk te zijn van het materiaal van de tanks (roestvrij staal of vertind koper). Het kwam ons voor, dat de zuurstofmelk, waarin wel groei der zuurstofflora was opgetreden, iets minder afwijkend van smaak was dan die, waarin de ontwikkeling der zuurstofflora uitgebleven was.

TABEL 17

Aantal dagen	5 atm. overdruk		8 atm. overdruk	
	Geur	Smaak	Geur	Smaak
2	normaal	normaal	normaal	normaal
5	"	"	"	"
8	"	"	"	zoetig
12	"	flauw, zoet	"	iets flauw
16	flauw	zoet	"	—
20	normaal	flauw	"	iets flauw
27	"	"	"	flauw
33	iets onaangenaam	iets wrang	flauw	"
41	niet frisch	" "	iets flauw	flauw, zoetig
48	zurig	iets wrang, flauw	iets onaangenaam	wrang
55	"	iets wrang, flauw, bitter	iets zurig	zoet, iets bitter
62	iets zurig	iets wrang, flauw, zuur	" "	flauw, wrang
72	zurig	iets wrang, flauw	—	" , "

Aantal dagen	10½ atm. overdruk		11 atm. overdruk	
	Geur	Smaak	Geur	Smaak
2	normaal	normaal	normaal	normaal
5	"	"	"	flauw
8	"	iets zoetig	iets zoet	"
12	"	flauw, zoetig	zoet	—
16	"	" , "	flauw, zoet	flauw, zoet
20	"	flauw	normaal	iets flauw
27	"	"	"	flauw, zoet
33	flauw	zoet	"	flauw
41	normaal	"	"	"
48	"	zoet, flauw	—	—
55	"	" , "	—	—
62	"	" , "	iets zurig	wrang
72	"	flauw	" "	iets wrang, iets bitter
107	—	—	" "	flauw, zoet, wrang

In het bijzonder is er op gelet of de melk een vettigen of olieachtigen smaak zou krijgen tengevolge van vetoxydatie, doch dit kon niet geconstateerd worden. Bij het bewaren van room werden in dit opzicht wel afwijkingen gevonden, echter ook in slechts geringe mate (zie tabel 18).

Bij het bewaren op 21° C van uit de tanks getapte melk bleven geur en smaak nog wel 2 dagen goed, mits de afgetapte melk in het donker bewaard werd. Werd zij daarentegen in het diffuse daglicht bewaard, dan was zij reeds den volgenden dag volkomen ongenietbaar. Door verhitting van de melk na het aftappen en daaropvolgend bewaren in diffuus daglicht, werd de nadeelige werking van het licht slechts weinig verminderd.

TABEL 18

Aantal dagen	Room bij 9½ atm. overdruk Bacteriegroei opgetreden		Room bij 11 atm. overdruk Geen bacteriegroei opgetreden	
	Geur	Smaak	Geur	Smaak
6	normaal	normaal	—	—
13	"	"	—	—
20	"	iets flauw	—	—
34	iets sterk	iets vetzig	iets boterzuur	iets bitter
41	normaal	iets flauw	iets vetzig	flauw, iets bitter
48	iets sterk	flauw, zoet	—	—
55	" "	flauw, iets vetzig	iets vetzig	flauw, iets bitter, iets vetzig
65	flauw, iets vetzig	iets bitter	—	—
80	iets bitter	iets flauw	zoetig, iets vetzig, zurig	iets zuur, bitter
87	iets olieachtig	—	—	—

18. Proeven met gepasteuriseerde melk of room

Met gepasteuriseerde melk zijn nog slechts een tweetal oriënterende proeven genomen.

Bij de eerste proef werd de melk in een vertind koperen tank, geplaatst in een waterbad, dat met stoom werd verwarmd, verhit tot 80° C en hierop 10 minuten gehouden. Daarna werd afgekoeld tot 4° C, de tank gesloten en onder zuurstofdruk gebracht van 10½ à 11 atm. overdruk. Bewaard bij 4° à 5° C.

De gegevens vindt men in tabel 19. Daaruit blijkt, dat reeds na 11 dagen een ontwikkeling van bacteriën optrad, welke een sterk versneld verloop had. Het bereikte „plafond” was zeer hoog (16 miljoen). Zie ook figuur 12.

TABEL 19

*In de tank gepasteuriseerde melk. Zuurstofoverdruk
10½ à 11 atm. Temperatuur 4°—5° C*

Aantal dagen	Kiemgetal	Titer in n/10 per 100 g
0	18	—
4	13	16,2
11	130	16,0
18	590	16,2
25	14.500	16,0
32	385.000	16,2
39	3.580.000	16,8
46	9.600.000	18,0
53	13.200.000	18,4
61	13.900.000	19,4
74	14.100.000	19,4
82	16.000.000	19,4

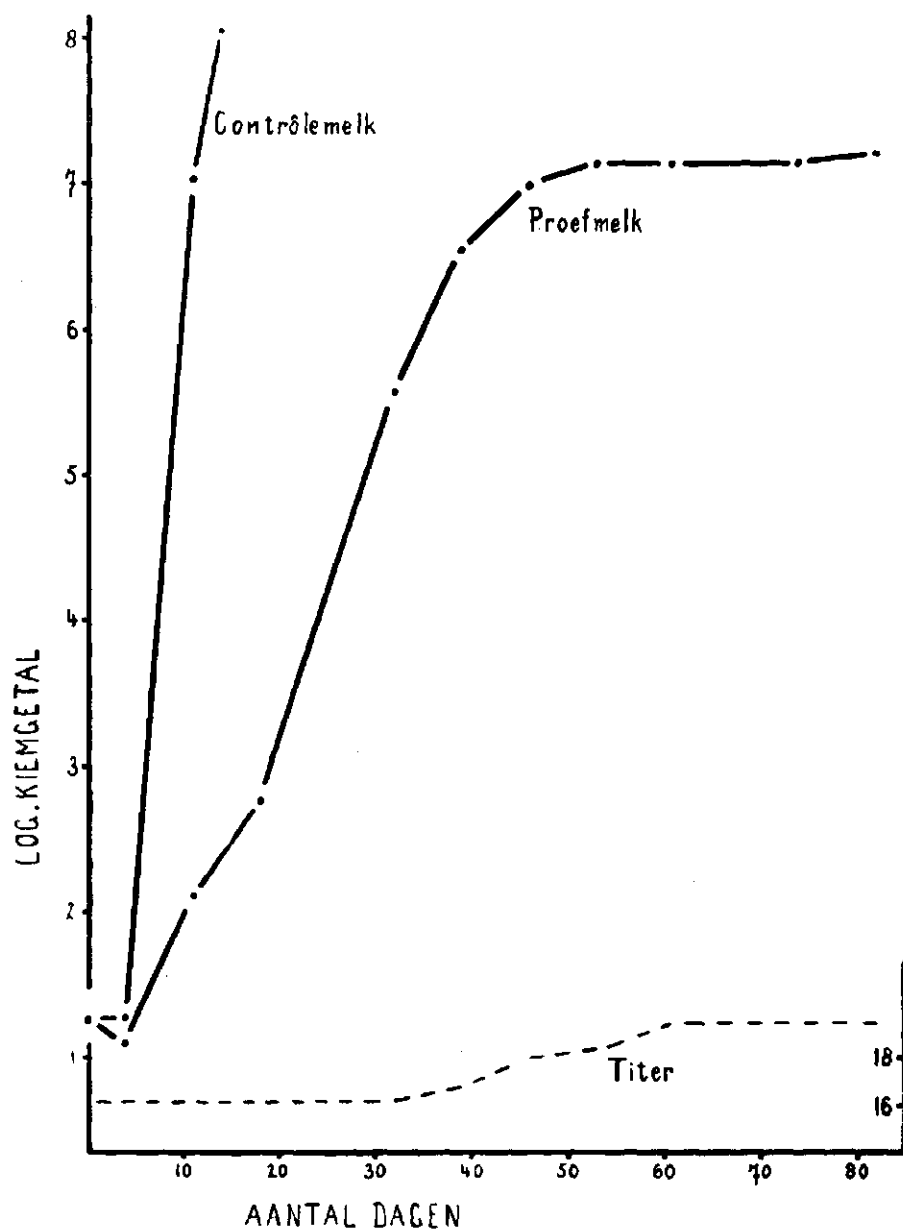


Fig. 12

Gepasteuriseerde melk bij 4°—5° C en 11 atm. zuurstofoverdruk. Infectie opgetreden of pasteurisatie niet geslaagd

Bij deze proef missen wij de phase der bacterievernietiging, zooals ook te verwachten is, omdat de bacteriën, die gedood zouden kunnen worden, reeds door de pasteurisatie vernietigd waren. De bacteriën, die in de melk groeiden, waren wederom van één soort en zooals gewoonlijk waren het weder melkzuurbacteriën, thans echter geen duplococcen, doch staafvormige. De melk werd dus een reïncultuur van deze melkzuurbacterie, die evenals de duplococcen der rauwe melk een zeer gering zuurvormend vermogen heeft. Het optreden dezer flora kan dus niet anders beteekenen dan dat of de pasteurisatie niet doeltreffend geweest is, of dat na de pasteurisatie infectie is opgetreden, daar de betreffende bacteriën het vermogen tot sporevorming missen. Deze proef is dus op dezelfde wijze verlopen als de proeven met gepasteuriseerde melk van andere proefnemers en bewijst, dat het niet eenvoudig is om zelfs onder gunstige omstandigheden de melk volkomen betrouwbaar te pasteuriseeren. Men moet er dus rekening mede houden, dat men den toestand niet verbetert door de tanks te vullen met op technische wijze gepasteuriseerde melk, wijl daarbij de kansen op besmetting met voor zuurstof ongevoelige bacteriën nog grooter zijn.

Door de zuurstofbehandeling was de kookgeur niet geheel verdwenen. De melk bleef goed van geur en smaak (de smaak hoogstens iets flauw) tot den 46sten dag. Daarna werd de geur eenigszins esterachtig en de smaak wrang.

Bij een andere proef met room, eveneens in de tank zelf gepasteuriseerd en pas na het pasteuriseeren onder 11 atm. zuurstofoverdruk gebracht, bewaard bij 4°—5° C, trad geen bacteriegroei op. Het aantal bacteriën bleef gedurende de 67 dagen, dat de room aldus bewaard werd, beneden 20 per ml en de titer bleef daarbij 15 ml n/10 per 100 g. De room was bij deze proef goed van geur en smaak gebleven (smaak hoogstens iets flauw).

Het is onze bedoeling de proeven met gepasteuriseerde melk nog voort te zetten.

19. Bereiding van boter uit onder zuurstofdruk bewaarden room

Bij twee proeven, waarin room (ongeveer 20 %) onder zuurstofdruk bewaard was gedurende ruim 2 maanden, werd deze op verschillende wijzen tot boter verwerkt.

De tanks werden gevuld op 6 Augustus 1937. De eene tank werd met inhoud gepasteuriseerd gedurende 10 min. op 80° C, de andere werd niet gepasteuriseerd. Bij beide werd een overdruk van 11 atm. zuurstof toegepast en de bewaring vond plaats bij 4°—5° C.

Na afloop van de proef bevatte de rauwe room 83 bacteriën per ml, de gepasteuriseerde minder dan 10. Er was dus geen bacteriegroei opgetreden.

De geur van den rauwen room was bij langzaam verwarmen tot koken toe eerst zoetig, iets vettig, dan zuur en de smaak was iets zuur, iets bitter. De geur van den gepasteuriseerden room was normaal, de smaak iets flauw.

Bij het aftappen van melk of room uit de tanks vormt zich in de afgetapte vloeistof veel schuim door het ontwijken van de opgeloste zuurstof. Bij melk breekt deze schuimlaag spoedig, bij room daarentegen niet. Dit is echter geen groot bezwaar bij de verdere behandeling. Bij het aftappen uit de tanks vormt zich ook in de tanks schuim, als gevolg van de drukverlaging en het schudden, dat men doet, om de homogene verdeling van het vet in den tankroom of de tankmelk te bewerkstelligen. Bij room is deze schuimvorming oorzaak van roomverlies, omdat men dit schuim moeilijk uit de tanks kan krijgen.

De gepasteuriseerde room werd verwerkt op 12 October 1937 (d.i. na 67 dagen) op verschillende manieren, n.l.

Gepasteuriseerd *), afgekoeld en zoet gekarnd op 12 October.

Gepasteuriseerd *), afgekoeld, gezuurd in donker en gekarnd op 13 October.

Gepasteuriseerd *), afgekoeld, gezuurd in zwak diffuus licht en gekarnd op 13 October.

Zoet gekarnd op 12 October.

Gezuurd in donker en gekarnd op 14 October.

Gezuurd in zwak diffuus licht en gekarnd op 14 October.

De rauwe room werd uit de tank getapt op 20 October 1937 (d.i. na 75 dagen) en ook op verschillende manieren verwerkt, n.l.

Gepasteuriseerd, afgekoeld en zoet gekarnd op 20 October.

Gepasteuriseerd, afgekoeld, gezuurd in donker en gekarnd op 22 October.

Zoet gekarnd op 20 October.

Gezuurd in donker en gekarnd op 22 October.

Na de bereiding werd de boter bij 10° C bewaard.

De beoordeeling op verschillende tijdstippen vindt men in tabel 20. Hier is alleen de smaak vermeld, daar de keuring op geur niet zoo scherp was. Na de laatste keuring is nog onderzocht of de boter bacteriologische afwijkingen vertoonde. Dit was niet het geval. De ongezuurde botermonsters waren steriel, de gezuurde bevatten slechts melkzuurbacteriën.

Uit de tabel is af te leiden, dat in het algemeen de kwaliteit van de boter, bereid uit den in gepasteuriseerden toestand bewaarden room, het beste was, dat het zuringsproces eerder eenig nadeel dan voordeel gebracht heeft en dat bij den rauw bewaarden room een pasteurisatie vóór de verwerking tot boter een kleine verbetering heeft veroorzaakt.

*) Deze porties werden dus twee keer gepasteuriseerd; de eerste keer bij het vullen van de tank, de tweede keer na het openen van de tank.

TABEL 20

Smaak van boter, bereid uit onder zuurstofdruk bewaarden room

Behandeling			Room, rauw bewaard			
			Versch 20—22/X	25/X	29/X	5/XI
Gezuurd	Gepast.	Donker	niet goed, wrang, metalig	slecht, spekkig	on- aangenaam	metalig
	Niet gepast.	Donker	niet goed, wrang, bitter	niet goed, ranzig	afwijkend, wrang	afwijkend
Niet gezuurd	Gepast.		goed	iets metalig	afwijkend	metalig
	Niet gepast.		on- aangenaam	afwijkend	iets ranzig	ranzig, zeepachtig

Behandeling			Room, gepasteuriseerd bewaard			
			Versch 12—14/X	16/X	25/X	29/X
Gezuurd	Gepast.	Donker	goed, iets kooksmak	goed, iets kooksmak	iets metalig, bijsmak	iets metalig
		Licht	goed, iets kooksmak	goed	iets kook of metaalsmak	iets afwijkend
	Niet gepast.	Donker	goed	iets vettig of metalig	iets metalig	iets scherp
		Licht	goed	iets vettig of metalig	slecht	afwijkend
Niet gezuurd	Gepast.		kooksmak	iets kooksmak	iets kooksmak	weinig afwijkend
	Niet gepast.		goed	iets metalig	goed	metalig

Tot slot rust op ons nog de plicht onze erkentelijkheid te betuigen aan den Chef-machinist van de N. V. Hoornsche IJsfabriek, den Heer W.J. TIMMERMANS, voor de vele raadgevingen en deskundige technische hulp, waarmede hij ons steeds bij dit onderzoek terzijde gestaan heeft.

CONCLUSIES

1. Bij het bewaren van rauwe melk of room onder zuurstofdruk bij temperaturen van 10°C en lager (Hofius-procédé) gedurende ongeveer 2 maanden vindt in den eersten tijd een vermindering van het bacterie-aantal plaats. Deze phase van bacterievernietiging wordt gevolgd door een phase van bacteriegroei. Nadat in de groeiphase het maximum aantal bacteriën bereikt is, wordt wederom een langzaam afnemen van het bacterieaantal geconstateerd (zie de figuren 1, 2, 4, 6 en 9).

2. De phase van bacterievernietiging duurt langer naarmate de zuurstof-overdruk hooger en de temperatuur lager is. De phase van bacteriegroei begint later en voert tot een lager bacteriemaximum bij lagere temperatuur en hooger en druk (zie de figuren 4, 8 en 9). Soms kan door toevallige omstandigheden deze groei bij lage temperatuur en hoogen zuurstofdruk in het verloop van 2 maanden achterwege blijven (zie figuur 7).

3. In melk, die gewoon aan de lucht bewaard wordt, treedt bij lage temperatuur (4° — 10°C) een bederf op ten gevolge van de ontwikkeling van gelatine-vervloeiende (eiwitaantastende) en coliachtige bacteriën, bij hooge temperatuur (20°C) een zuur worden der melk door den groei van melkzuurbacteriën van het type *Streptococcus lactis*. Ook coliachtige bacteriën ontwikkelen zich bij die temperatuur sterk.

Bij een zuurstofoverdruk van 10 atm. ontwikkelt zich echter een geheel andere flora. De toename van het bacterieaantal wordt dan bij alle temperaturen (4° — 20°C) veroorzaakt door den groei van bacteriën, welke tot de groep der melkzuurbacteriën behooren. Het zijn duplococci, die gekenmerkt zijn door een zeer gering zuurvormend vermogen. Door deze geringe zuurvorming stijgt de titer der melk dan ook slechts onbeteekenend, zoolang tenminste het aantal dezer bacteriën beneden ongeveer 1 miljoen per ml blijft (zie de figuren 1, 2, 4, 10 en 11).

4. Het eigenaardige verloop van het bacterieaantal in de onder zuurstof bewaarde melk moet dus verklaard worden door het feit, dat tegelijkertijd een langzame dooding van de gewone melkbacteriën en een langzame groei van de typische voor zuurstof weinig gevoelige, langzaam zurende melkzuurbacteriën optreedt (zie de figuren 3 en 5).

5. De gewone melkzuurbacteriën (*Streptococcus lactis*) groeien niet bij een overdruk van 10 atm. zuurstof, zelfs niet bij 20° C.

Bij 4°—5° C zijn gelatine-vervloeiende bacteriën nog in staat zich bij 1 atm. zuurstofoverdruk te ontwikkelen, bij 2 atm. en hooger niet meer.

6. Coliachtige bacteriën groeien bij 4°—5° C nog bij 2 atm. zuurstofoverdruk, doch bij 3½ atm. en hooger niet meer. De typische coli-aerogenes-bacteriën sterven boven dezen druk snel af. Er werden in melk echter atypische coliachtige bacteriën gevonden, die zich onderscheiden door een lager temperatuuroptimum en geringe gasvorming uit glucose en deze werden door de zuurstof veel langzamer gedood.

7. Bij het aftappen van melk uit de kraan van de onder zuurstofdruk staande tanks worden de in de verse rauwe melk voorkomende bacterieklompjes stukgeslagen, waardoor men in de eerste dagen in de afgetapte melk een hooger bacterieaantal vindt dan in de melk, waarmede de tanks gevuld werden (zie de figuren 1, 4, 6, 7 en 9).

De toename van het bacterieaantal als gevolg van deze desintegratie der bacterieklompjes is afhankelijk van den druk. Bij een overdruk van 10 atm. vonden wij in onze proeven een toename tot 1000 à 1500 %. Bij hoogen druk is zij dus zeer groot.

8. Geur en smaak, welke het scherpst beoordeeld kunnen worden door de bewaarde melk of room te verwarmen, zijn in geringe mate afwijkend. Bij bewaring bij 4°—5° C en 10 atm. zuurstofoverdruk is de melk reeds na weinig dagen „iets flauw” van smaak. Later wordt ook „iets zoet” geconstateerd. Geur en smaak worden langzamerhand iets slechter, zoodat na 2 maanden bewaren melk iets onaangenaam en room iets vettig is. Wij kregen den indruk, dat in melk, waarin in het geheel geen bacteriegroei is opgetreden (zie punt 2), de geur- en smaakafwijkingen iets duidelijker zijn dan in melk, waarin de normale geringe ontwikkeling van *duplococci* is opgetreden.

9. Onze proeven met gepasteuriseerde melk leidden nog niet tot een definitief resultaat. Ondanks de genomen voorzorgen was of de pasteurisatie niet volledig of er was na de pasteurisatie infectie opgetreden, waardoor tijdens het bewaren onder zuurstof een soortgelijk groeiproces optrad als bij rauwe melk. Dit bewijst wel, dat men geen verbetering van de conserveering kan verwachten indien men de tanks met technisch gepasteuriseerde melk gaat vullen, aangezien onze voorzorgsmaatregelen zeker doeltreffender waren dan die, welke bij een technische pasteurisatie genomen worden. De proeven met gepasteuriseerde melk worden echter voortgezet.

10. Boter werd bereid van gedurende 2 maanden bij 4°—5° C en bij 11 atm. zuurstofoverdruk bewaarden room, zoowel van room, welke rauw in de tank gebracht was, als van room, die in de tank gepasteuriseerd was.

Bij beide was tijdens het bewaren geen bacteriegroei opgetreden. De kwaliteit en de duurzaamheid van de boter, bereid van in rauwen toestand bewaarden room, waren onvoldoende, die van de boter, bereid van in gepasteuriseerden toestand bewaarden room, waren vrij goed, vooral die van den zoet gekarnden room.

11. De duurzaamheid van de uit de tanks afgetapte melk, voor zoover daarmede bedoeld wordt het aantal dagen, gedurende welke de melk bij 21° C zichtbaar onveranderd blijft, wordt grooter naarmate de melk langer in de tanks verblijft. In den loop van 2 maanden kan de tijd, na welken de melk bij 21° C ten gevolge van de melkzuurproductie coaguleert, toenemen van 3 tot 6 à 9 dagen. Dit wordt veroorzaakt door de omstandigheid, dat de snelzurende melkzuurbacteriën in verloop van tijd door de werking der zuurstof vernietigd worden.

Bewaring van de afgetapte melk in het licht veroorzaakt een snelle ontwikkeling van smaakafwijkingen.

12. Temperatuurverhooging of drukverlaging tijdens het bewaren van de melk hebben als gevolg een sterkeren groei der voor zuurstof weinig gevoelige, zwak zurende melkzuurbacteriën (zie de figuren 10 en 11). Aan de gasdichtheid der tanks moet dus groote zorg besteed worden.

S A M E N V A T T I N G

Bij het bewaren van rauwe melk bij een temperatuur van 4°—5° C en een zuurstofoverdruk van 10 atm. gedurende ongeveer 2 maanden, worden de bacteriën van het gewone melkbederf langzamerhand gedood. Na zekeren tijd treedt echter groei op van een bijzondere, voor zuurstof weinig gevoelige bacteriesoort, welke tot de groep der melkzuurbacteriën behoort, doch slechts een zeer zwak vermogen tot zuurvorming bezit. Het kiemgetal stijgt hierdoor evenwel tot hoogstens 500.000 per ml. Hoewel dus uit bacteriologisch oogpunt het procédé niet ongunstig is, werden in de bewaarde melk geur- en smaakafwijkingen geconstateerd, echter niet in ernstige mate.

PRESERVATION OF MILK AND CREAM WITH OXYGEN UNDER PRESSURE

CONCLUSIONS

1. While keeping raw milk or cream under oxygen pressure at temperatures of 10° C and below (Hofius method) during about 2 months in the first period a decrease of the number of bacteria takes place. This period of bacterial destruction is followed by a (second) period of bacterial growth. When the maximum number of bacteria has been reached a slow decrease of the bacterial number may be observed (See graphs 1, 2, 4, 6 and 9).

2. The first period lasts longer if the oxygen pressure is higher and the temperature is lower. The maximal number of bacteria found at the end of the second period (growth period) is larger if the oxygen pressure is lower and the temperature is higher. (See graphs 4, 8 and 9). At high pressure and low temperature sometimes no growth occurs in the course of 2 months (See graph 7).

3. Milk, kept at the air under ordinary conditions at low temperature (4°—10° C) is spoilt as the result of the development of liquifying bacteria, attacking proteins and of coliform organisms. At higher temperatures (e.g. 20° C), milk is soured by lactic acid bacteria of the type *Streptococcus lactis*; coliform bacteria develop strongly too.

At an oxygen pressure of 10 atmospheres (the oxygen pressure is expressed as the number of atmospheres *over* the atmospheric pressure) however a typical bacterial population develops. The bacterial increase of the second period is then at high as well as at low temperature due to the growth of duplococci, belonging to the group of lactic acid bacteria, which produce but small amounts of acid. Therefore the titratable acidity of the milk practically shows no increase unless the number of these bacteria exceeds 1 million per ml (See graphs 1, 2, 4, 10 and 11).

4. The characteristic changes in the number of living bacteria in the milk, kept under oxygen, is explained by the fact that 2 processes take place simultaneously, *viz.* a slow destruction of the common milk bacteria and a slow growth of the typical, oxygen resisting, slow acid forming lactic acid bacteria (See graphs 3 and 5).

5. The common lactic acid bacteria (*Sc. lactis*) do not thrive at an oxygen pressure of 10 atm., even not at 20° C.

At 4°—5° C gelatin liquifying bacteria develop at an oxygen pressure of 1 atm.; they do not grow at a pressure of 2 atm. or more.

6. Coliform organisms do not develop at 4°—5° C if the oxygen pressure

is 3.5 atm. or more. At a pressure of 10 atm. the typical coli-aerogenes bacteria are soon killed. Sometimes milk contains atypical coli bacteria, which are characterised by a low temperature optimum and the formation of but small quantities of gas from dextrose. These bacteria survive longer in the oxygen milk than the typical ones.

7. When milk is drawn from the tanks by means of the stopcock the clumps of bacteria are partly disintegrated (homogenising action). Consequently the number of bacteria, determined with the plate method, in the milk samples, taken during the first days from the tanks standing at 4°—5° C., is higher than in the fresh milk with which the tank was filled (See graphs 1, 4, 6, 7 and 9). The increase of the bacterial number caused by this disintegration process depends on the oxygen pressure in the tank. At a pressure of 10 atm. we observed an increase of 1.000 to 1.500 %.

8. Odour and flavour, which are best judged by warming the milk or the cream, are slightly abnormal. At 4°—5° C. and 10 atm. oxygen pressure the taste of the milk becomes somewhat flat after a few days; afterwards a sweet taste is observed. Odour and flavour gradually become less good; after 2 months they are somewhat disagreeable in milk and slightly oily in cream. It seems that milk in which a bacterial growth did not occur (as it sometimes happens) develops a more pronounced odour and flavour defect than milk in which the normal growth of the duplococci mentioned before took place.

9. Our experiments with pasteurised milk did not yet lead to any definite conclusion. Though the pasteurisation was carried out with many precautions a growth of rod forms (also belonging to the group of lactic acid bacteria) took place, probably because of an insufficient pasteurisation or of a contamination. This makes it uncertain, whether a better preservation, when using technically pasteurised milk, can be expected, as the precautions, taken under practical conditions, will be less efficient than ours. The experiments with pasteurised milk are continued.

10. Pasteurised and raw cream, kept at 4°—5° C. and 11 atm. oxygen pressure during 2 months, were buttered. In both no bacterial growth had taken place. Odour and flavour and the keeping quality of the raw cream butter were insufficient, those of the pasteurised cream butter were rather good, especially of the sweet cream butter.

11. The keeping quality of the milk, taken from the tanks (4°—5° C., 10 atm. oxygen pressure), with which is meant the period during which the milk remained visibly unaltered when kept at 21° C. under normal conditions, gradually increases. In the course of 2 months the time in which the drawn milk coagulates at 21° C. increases from 2—3 to 6—9 days. This is due to the gradual destruction of the rapidly acidifying lactic acid bacteria in the tank.

When milk, drawn from the tank, is kept in a glass jar at the daylight soon an off flavour develops.

12. The tanks must be thoroughly gastight and kept at a constant temperature because a decrease of the oxygen pressure or a rise in temperature is followed by a more active growth of the duplococci, mentioned above (See graphs 10 and 11).

S U M M A R Y

When keeping raw milk or cream at 4°—5° C and an oxygen pressure of 10 atmospheres during about 2 months the bacteria, which spoil the milk under normal conditions, are gradually killed. After some time growth of a typical bacterium, resistant to high oxygen pressure, is observed. This bacterium, a duplococcus, belongs to the group of lactic acid bacteria; however it is a slow acid former. The number of these bacteria increases to about 500.000 per ml. Though the procedure is not unpromising from a bacteriological point of view, odour and flavour of the milk and the cream are not wholly satisfying. The difference from normal milk however is only slight.

LITERATUUR

- (1) J. BASSET, M. MACHEBOEUF et E. WOLLMAN, Etudes biologiques effectuées grace aux ultra-pressions. *Ann. de l'Inst. Pasteur* **58** (1937) 58.
- (2) W. P. LARSON, T. B. HARTZELL and H. S. DIEHL, The effect of high pressure on bacteria. *Journ. of inf. diseases* **22** (1918) 271.
- (3) M. J. PRUCHA, J. M. BRANNON and H. A. RUEHE, Effect of carbonation on bacterial content and keeping quality of dairy products. *Ill. Agr. Exp. Stat., Bulletin* 368, 1931.
- (4) T. PORODKO, Studien über den Einfluss der Sauerstoffspannung auf pflanzlichen Mikroorganismen. *Jahrb. f. wiss. Botanik* **41** (1904) 1.
- (5) A. MEYER, Bemerkungen über Aerobiose und Anaerobiose. *Zentralbl. f. Bakt.* I, **49** (1909) 305.
- (6) MOHR, BAUR, DAMM, SCHWARZ, FINZENHAGEN, PLOCK und TREIBER, Das Hofiusverfahren. *Deutsche Molkereiztg. Kempten* 5. Nov. 1936.
- (7) W. MOHR und K. BAUR, Das Hofiusverfahren. *D. Molk.ztg. Kempten* 27. Mai 1937.
- (8) K. RICHTER, Das Hofiusverfahren. *Molkereiztg. Hildesheim* **45** (1936) 1347.
- (9) J. RODENKIRCHEN, Untersuchungen über das Hofiusverfahren. *Milchw. Forschungen* **18** (1937) 255.